

**BILDUNG ABNORM STRUKTURIERTER
NUCLEOTIDE MIT DER GLYCOHYDROLASE
AUS DER MIKROSOMALEN FRAKTION
VERSCHIEDENER RATTENORGANE**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Manfred Klingenuß

aus Bammental/Heidelberg

1972

**BILDUNG ABNORM STRUKTURIERTER
NUCLEOTIDE MIT DER GLYCOHYDROLASE
AUS DER MIKROSOMALEN FRAKTION
VERSCHIEDENER RATTENORGANE**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Manfred Klingenuß

aus Bammental/Heidelberg



Erster Gutachter: Prof.Dr.H.Merken

Zweiter Gutachter: Prof.Dr.M.Wenzel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.März 1972

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung	Seite 1
II	Methoden	Seite 6
	A) Herstellung der Nucleosidase enthaltenden Mikrosomenfraktion	Seite 6
	B) Reaktionsansätze	Seite 6
	C) Ionenaustauschchromatographie	Seite 8
	D) Gefriertrocknung	Seite 9
	E) Papierchromatographie	Seite 10
	F) Hochspannungselektrophorese	Seite 11
	G) Identifizierung der Substanzen	
	1) Aufzeichnen der UV-Spektren	Seite 12
	2) Enzymatische Hydrierbarkeit der Nucleotide	Seite 12
	3) Komplexbildung mit KCN	Seite 13
	4) Aufzeichnung der IR-Spektren	Seite 13
	5) Phosphatbestimmung nach Berenblum und Chain	Seite 13
	6) Phosphatbestimmung nach Fiske, Subbarow und Bartelelt	Seite 15
	7) Ribosebestimmung nach Meybaum	Seite 15
	8) Schmelzpunktbestimmung	Seite 17
	9) Saure Hydrolyse	Seite 17
	10) Alkalische Hydrolyse	Seite 17
	H) Versuche der enzymatischen Synthese von NADP-Analogen in vivo	Seite 18
	I) Spektro-fluorometrische Bestimmung der natürlichen und der 6-AN-Pyridinnucleotide in den Nieren	Seite 19
	J) Diureseversuch an der Infusionsmaschine nach Herken, Senft, Schwarz, Merker	Seite 23
	1) Bestimmung des Glucuronidgehalts des Harns	Seite 23
	2) Quantitative Bestimmung des 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamids im Harn	Seite 25
	3) Aufarbeitung des Rattenharns zur Papierchromatographie	Seite 25

K) Darstellung von N-Methyl-6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid Seite 26

L) Enzymatische ATP-Messung in der Niere nach Gabe von 6-Amino-Nikotinamid und Folsäure Seite 27

III Ergebnisse

- A) 1) Versuche über den enzymatischen Einbau des 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridins in NADP in vitro Seite 29
- 2) Versuche über den enzymatischen Einbau des 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridins in NADP in vitro unter Zusatz verschiedener Lösungsvermittler Seite 41
- 3) Versuche über den enzymatischen Einbau von 1,3-Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Hydroxy Pteridin und 1,3-Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Chlor-Pteridin als Antimetabolite in NADP in vitro Seite 42 a
- 4) Versuch der enzymatischen Synthese falsch strukturierter Pyridinnucleotide mit Pyridinderivaten als Antimetabolite Seite 43
- a) 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid als Antimetabolit Seite 44
- b) 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin als Antimetabolit Seite 46
- c) 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit Seite 49
- 5) Versuch der enzymatischen Synthese falsch strukturierter Pyridinnucleotide in vivo mit 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit Seite 60
- 6) Glucuronidbestimmung im Harn von Ratten nach Gabe von 100 mg/kg 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid Seite 61
- B) 1) Enzymatischer Austausch von 6-Aminonikotinsäureamid gegen Nikotinamid des NADs und NADPs in vivo in der Ratteniere in der Proliferationsphase nach Gabe von 500 mg/kg Folsäure iv. Seite 64 a
- 2) ATP-Messung in der Ratteniere nach Gabe von 500 mg/kg Folsäure und 50 mg/kg 6-Amino-Nikotinsäureamid Seite 67

IV Diskussion Seite 71

V Zusammenfassung Seite 77

Literaturverzeichnis Seite 79

I. E I N L E I T U N G

1953 haben Kaplan und Mitarbeiter (1) nachgewiesen, daß die in der Mikrosomenfraktion vorhandene Nucleosidase (NAD(P)-Glycohydrolase E.C.3.2.2.6.) die oxydierten Pyridinnucleotide hydrolytisch spaltet und darüber hinaus eine Katalyse des Austausches von freiem Nikotinamid und im Nucleotid gebundenen erzeugt.

1954 gelang der gleichen Gruppe der Nachweis, daß nicht nur Nikotinamid von dem Enzym ausgetauscht werden kann, sondern auch strukturverwandte Stoffe wie 3-Acetylpyridin oder Iso-Nikotinsäurehydrazid, ja sogar Imidazolderivate (2,3,4). Es wurde klar, daß die NAD(P)-Nucleosidase nur sehr wenig spezifisch ist. Neuere Untersuchungen haben diesen Befund bestätigt (5,6,7,8). Die dabei auftretenden, falsch strukturierten Pyridinnucleotide sind mitunter in der Lage, genau wie die natürlichen Nucleotide mit dem gleichen Rezeptor zu reagieren, aber ohne deren Funktion zu übernehmen (9,10,11)..

So können durch Einwirkung von einigen Pyridinderivaten auf den Organismus erhebliche Störungen hervorgerufen werden. Es stellten Herken und Mitarbeiter (12,13) fest, daß Ratten, die 3-Acetylpyridin injiziert erhalten hatten, Erregungszustände bekamen, die sich in ständig wiederholenden, langanhaltenden Rollkrämpfen und Gleichgewichtsstörungen zeigten.

Nach Gabe von 6-Amino-Nikotinamid treten nach mehrstündiger Latenz schlaffe Lähmungen auf; die Tiere werden apathisch, die Körpertemperatur sinkt ab (14,15,16), und die Tiere sterben bei Gaben um 50 mg bis 100 mg/kg nach mehreren Tagen, ohne daß eine Veränderung des Zustandes sichtbar wird.

In verschiedenen Organen der vergifteten Tiere lassen sich die abnorm strukturierten Pyridinnucleotide nachweisen. Dabei sind Leber, Gehirn und Nieren besonders reich an falschem Nucleotid (17).

Die natürlichen Pyridinnucleotide üben im Stoffwechsel der Zelle die Funktion einer Wasserstoff-Transferierung aus. Diese besteht darin, daß in Stellung 4 des Pyridinringes unter Aufspaltung der Doppelbindung zwei Wasserstoffatome addiert werden, die später wieder abgegeben werden können (18).

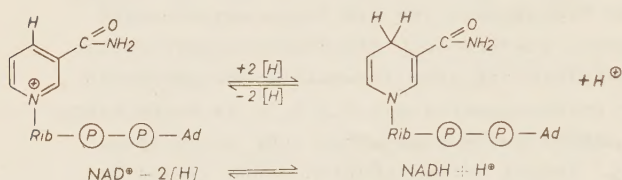


Abb. 1

Wasserstofftransport beim NAD (nach Karlson 1966)
Ad= Adenosin

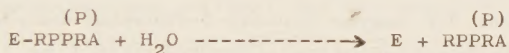
Es ist verständlich, daß NAD(P)-Analoge, die in Stellung 4 des Pyridinringes substituiert sind, kein Wasserstoffatom mehr aufnehmen können, so auch nicht als wasserstoffüberträger fungieren können. Beispielsweise ist das in 6-Stellung Amino-substituierte 6-ANAD(P) nicht hydrierbar (19), und es kann als wasserstoffcarrier nicht reagieren. Darüber hinaus ist 6-ANAD(P) ein Hemmstoff verschiedener NAD(P)-abhängiger Enzymsysteme über das Prinzip eines kompetitiven Antagonismus (10,20). Nach den Vorstellungen von Kaplan und Mitarbeitern (21,22) arbeitet die Nucleosidase (NAD(P)-Glycohydrolase) nach folgendem Prinzip: Zunächst bildet sich zwischen der Nucleosidase E und dem Substrat NRPPRA unter Abspaltung von Nikotinamid (NA) ein Komplex E-RPPRA.



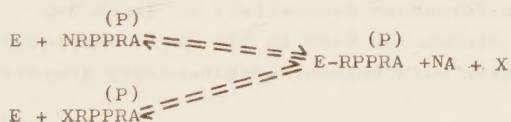
Durch Erhöhung der Konzentration an freiem NA wird die Reaktion in Richtung der Synthese von NAD(P) verschoben.

Dabei kann wie erwähnt das freie NA gegen das im NAD(P) gebundene ausgetauscht werden (23).

Wird die Nikotinamid-Konzentration verringert, so verschiebt sich das Gleichgewicht nach rechts, der Adenosindiphosphatribose-(Phosphat)-Komplex reagiert mit Wasser, und es entsteht in einer irreversiblen Reaktion freies Adenosindiphosphatribose (Phosphat).



Enthält der Reaktionsansatz neben oder statt NA einen Antimetaboliten des NA, so kann unter bestimmten Bedingungen nicht nur das Vitamin, sondern auch das Antivitamin (X) mit dem Enzymkomplex reagieren, wobei NAD(P)- Analoge entstehen.



Welche Analogen gebildet werden und welches Ausmaß die Synthese erreicht, hängt von der Konzentration des Antagonisten, seiner Affinität zum Enzymkomplex, von der Stabilität der Analogen gegenüber der enzymatischen Hydrolyse und sicher noch weiteren bisher unbekannten Faktoren ab (24,25).

Herken, Senft und Zemisch haben 1964 in Versuchen festgestellt, daß das 6-AN auch einen Einfluß auf die Funktion der Nierentubuli ausübt(16), der im wesentlichen aus einer 6bis8stündigen Natriurese besteht, deren Maximum mit dem Maximum der Synthese des 6-AN-Nucleotids zusammenfällt. Die Kalium-Ausscheidung ist nach 6-AN-Gabe geringfügig reduziert.

Vergleichende Untersuchungen derselben Autoren sprechen dafür, daß die Angriffspunkte des 6-AN und des Triamterens, eines Pteridinderivates, im gleichen distalen Tubulusbereich liegen. Ob beide Stoffe über den gleichen Wirkungsmechanismus der Nucleotidbildung in die Stoffwechselvorgänge eingehen, ist bis jetzt nicht genügend geklärt.

Nach 500 mg/kg Folsäure, einem Pteridinderivat, kommt es nach 96 Stunden zu einer Proteinvermehrung in der Niere von etwa 40% (58). Die Steigerung des Proteingehaltes ist mit einer Steigerung der Syntheseraten der Nucleinsäuren verbunden. Untersuchungen von Herken, Voß, Brade und Kolbe(1970) ergaben eine durch Actinomycin D und Cycloheximid hemmbare, Folsäure-induzierte Aktivitätssteigerung der Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase (64).

Da in dieser Arbeit demonstriert wurde, daß die nach Folsäuregabe vermehrte Glucoseumbildung in Ribose durch 6-AN hemmbar ist, war es interessant, zu untersuchen, inwieweit diese Hemmung auf eine Aktivitätssteigerung der Nucleosidase, induktiver oder nicht induktiver Genese, zurückzuführen ist. Diese Fragestellung wurde in vivo-Versuchen bearbeitet, in denen der enzymatische Einbau des 6-AN in die Pyridinnucleotide von Rattennieren nach Folsäurevorbehandlung gemessen wurde.

Da die Frage offen war, ob Triamteren über das Prinzip eines kompetitiven Antagonismus unter Bildung abnorm strukturierter Nucleotide in die Stoffwechselvorgänge eingreift, wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit untersucht, abnorm strukturierte Pyridinnucleotide mit 7-Desamino-Triamteren und ähnlich gebauten Pteridinen als Antimetabolite darzustellen.

Es wurde weiter untersucht, ob eine enzymatische Synthese abnormer Pyridinnucleotide in vitro und in vivo mit strukturverwandten Substanzen zum Nikotinamid mit Hilfe

der Nucleosidase möglich ist, um eine Aussage über die Bindungsverhältnisse machen zu können.

Zur Prüfung dieser Frage wurden folgende Pyridinderivate ausgewählt:

- | | | |
|-----------------------------------|-------|-----|
| 1. 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid | Abb.2 | S.5 |
| 2. 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid | Abb.3 | S.5 |
| 3. 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin | Abb.4 | S.5 |

Um einen Einblick in den Metabolismus abnorm strukturierter Pyridinnucleotide, bzw. der entstandenen Nucleotidanalogen zu bekommen, wurde dies an der Ausscheidung des 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamids in Zeitabhängigkeit untersucht. Weiterhin wurde der glucuronidierte Anteil in der Urinausscheidung bestimmt und die Möglichkeit einer Metabolisierung der Substanz durch Reaktionen am Pyridinstickstoff durch N-Methylierung geprüft.

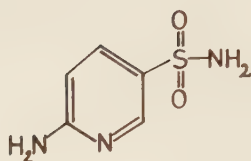


Abb.2 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid

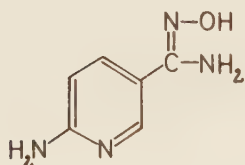


Abb.3 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid

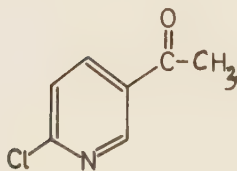


Abb.4 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin

II. M E T H O D E N

A. Herstellung der Nucleosidase enthaltenden Mikrosomenfraktion

Die verwendeten Mikrosomenpräparate verschiedener Gewebe wurden nach dem Homogenisieren der Organe nach den Angaben von Coper, Helge, Herken (27) angefertigt. Es wurde vorwiegend Gehirn oder Milz von männlichen Albino-Ratten (Wistar) im Gewicht von 150-180 g zur Verarbeitung gebracht. Die Auftrennung der Zellfraktionen erfolgte in 0,25 molarer Saccharoselösung bei $+4^{\circ}\text{C}$ nach folgendem Schema: s. Abb. 5 S. 7

Die anschließende Bestimmung des Stickstoffgehaltes des Proteins erfolgte mit jeweils 0,2 - 0,5 ml Homogenat nach Kjeldahl.

B. Reaktionsansätze

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurde für die " in vitro " - Versuche folgender Reaktionsansatz festgesetzt:

1. NAD bzw. NADP gelöst in m/15 Phosphatpuffer von pH 6,6. Endkonzentration der Lösung $5 \cdot 10^{-3}$ molar bis $1 \cdot 10^{-3}$ molar.
2. Antimetabolit: 10^{-1} molar oder soweit als löslich.
3. 1 - 2 mg Mikrosomenprotein/ml Reaktionsansatz.
4. Inkubationszeit: 2 - 4 Stunden je nach Versuch bei 37°C .

Die Reaktion wurde durch Denaturieren des Enzymproteins durch rasches Erhitzen auf 96°C für 1 min im Wasserbad gestoppt. Das gefällte Eiweiß wurde durch Abzentrifugieren in einer Ecco-Laborzentrifuge 3000 U/min 10 min lang abgetrennt. Der klare Überstand wurde der Ionenaustauschchromatographie zugeführt.

Schema für die Fraktionierung von Zellbestandteilen

nach Coper, Helge, Herken (1962) (27)

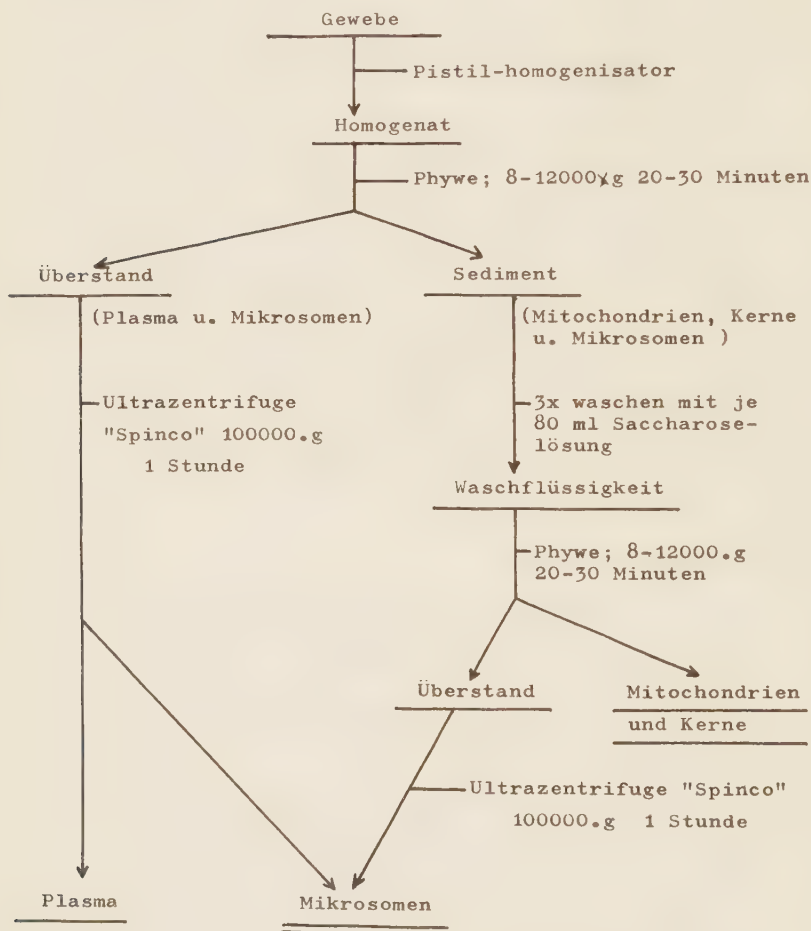


Abb. 5

C. Ionenaustauschchromatographie

Zur Trennung des im Reaktionsansatz enthaltenen Substanzgemisches wurde ein Verfahren der Ionenaustauschchromatographie benutzt, das von Cohn (28), Cohn und Carter (29) entwickelt, von Brumm und Potter (30) und Koransky (31) verbessert wurde.

Dazu wurde eine mit einem Hahn verschließbare Glas-säule von 2 cm lichter Weite mit in Wasser suspen- diertem Ionenaustauscherharz Dowex 1x10 Formiat- Form etwa 15 - 20 cm hoch beschickt. Auf diese Säule wurden die im Reaktionsansatz enthaltenen Substanzen aufgebracht. Basische Verbindungen, Saccharose und Nikotinamid werden vom Austauscherharz nicht gebunden und werden mit Aqua dest. in einem Vorwaschgang ab- getrennt. Man kontrolliert diesen Prozeß einfach da- durch, indem man die Extinktion bei 260 nm des Durch- laufes dauernd kontrolliert. Dies geschah durch eine an der Apparatur angebrachten Photozelle, die die E_{260} der durchlaufenden Flüssigkeit registrierend mißt. Das Vorwaschen ist beendet, wenn die Extinktion an- nähernd null wird. Jetzt erfolgt die eigentliche Trennung der am Austauscher haftenden Stoffe durch Gradientenelution mit Ameisensäure steigender Konzen- tration.

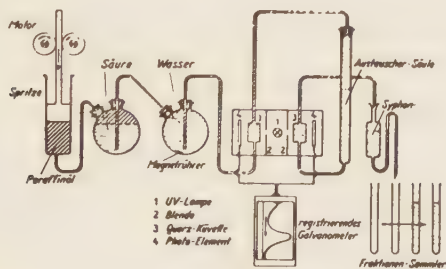


Abb. 6

Schemat. Darstellung der Apparatur für die Anionenaustausch- Chromatographie nach Koransky (31)

Aus dem Vorratskolben tropfte 4n(0,1n) Ameisensäure mit definierter Geschwindigkeit in ein Mischgefäß, das mit Wasser gefüllt und mit einem Magnetrührer versehen war. Aus dem Mischer wurde nun die ständig in der Konzentration an Ameisensäure steigende Flüssigkeit zur Ionenaustauschersäule geleitet und tropfenweise auf den Austauscher gebracht. Dickflüssiges Paraffin diente dabei als Drucküberträger vom Druckkolben auf das Mischsystem. Die Geschwindigkeit der Elution war regelbar durch Wechseln der Bleiwichte auf den Druckkolben und auch durch die Hähne A und B. Das Säuleneluat wurde durch einen Probensammler in Reagenzgläsern in Portionen zu ca. 5 ml aufgefangen und spektrophotometrisch glasweise bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die einzelnen Werte wurden in einem Koordinatensystem graphisch dargestellt. Die einzelnen zu einer Bande gehörenden Glashalte wurden vereinigt, das Gesamtvolumen und die Extinktion des Gesamtvolumens gemessen. Die Fraktionen wurden nun der Gefriertrocknung zugeführt.

D. Gefriertrocknung

Um die Substanzen vom Lösungsmittel möglichst schonend zu befreien, wurde Gefriertrocknung angewendet. Durch Zusatz von 1 bis 2 Tropfen Glyzerin wurde ein Schäumen der Flüssigkeit verhindert. Zunächst erfolgte das Einfrieren durch Eintauchen in Alkohol von -40° bis -50° C. Die Entfernung des Lösungsmittels geschah im Vakuum bei 0,1 Torr und -20° C ohne Substanzverlust. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst und durch Fällung mit einem Aethanol-Äther-Gemisch (3:1) weiter gereinigt.

E. Papierchromatographie

	Lösungsmittelsysteme (Fließmittel)		Trennung der Pyridinnucleotide
1)	Isobuttersäure	57 Teile	
	Ammoniak	4 Teile	+
	Wasser	39 Teile	
2)	n-Propanol	60 Teile	
	Ameisensäure	10 Teile	++
	Wasser	30 Teile	
3)	n-Butanol	11 Teile	
	Aethanol	1 Teil	+
	Ammoniak	2 Teile	
	Wasser	1 Teil	
4)	Aethanol	1 Teil	
	Essigsäure	1 Teil	(+)
5)	Chloroform	15 Teile	
	Methanol	15 Teile	-
	Aethanol	15 Teile	
	Eisessig	5 Teile	

Zur weiteren Trennung bzw. Reinigung der durch Fällung erhaltenen Substanzen wurden diese in Wasser gelöst und auf Whatmanpapier 30 x 32 cm Nr.I rechromatographiert. Dazu dienten die Gemische der obigen Tabelle.

Gemisch Nr. 2 erwies sich als günstigstes Laufmittel für die Trennung der Adeninderivate, Pteridine, und Pyridinderivate.

Das Gemisch Nr. 1 wurde nach längerer Benutzung abgesetzt, weil die Isobuttersäure erst nach längerem Trocknen aus dem Chromatogramm verdunstete. Ein

weiterer Grund dafür war eine stark fluoreszierende Bande in Höhe der Laufmittelfront.

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte aufsteigend 15 bis 17 Stunden lang in Glasglocken von 50 cm Höhe und 20 cm Durchmesser.

Das Auftragen der Substanzen erfolgte mit einer Blutzuckerpipette, an die ein Polyäthylenröhrchen angesetzt war, auf eine Startlinie, die 3 cm vom unteren Papierrand entfernt war. Als zweckmäßig erwies sich, auf ein cm Papierstrecke eine Menge aufzutragen, die eine Extinktion bei 260 nm = 1,0 besitzt, um eine gute Auftrennung zu erhalten. Nach dem Entwickeln wurden die Papierchromatogramme im kalten Luftstrom getrocknet und die Substanzareale unter UV-Licht markiert. Die so behandelten Papierchromatogramme wurden zum Zwecke der Dokumentation mit dem Photoprint-Verfahren nach Markham und Smith (32) photographisch festgehalten. Danach wurden die Substanzflecken aus dem Papier ausgeschnitten und mit Aqua dest. unter einer Glocke absteigend eluiert. Infolge der Kapillarwirkung des Papiers läuft Wasser aus einem Vorratsgefäß an den Papierstreifen hinab, löst die Substanzen und sammelt sich in einer Vorlage.

Jetzt erfolgte entweder Fällung durch Alkohol-Äther(3:1) oder im Falle einer mangelhaften Auftrennung anschließend Hochspannungs-Elektrophorese.

F. Hochspannungselektrophorese

Einige Substanzen zeigten bei der Papierchromatographie so ähnliche Eigenschaften, daß zur Trennung noch die Anwendung einer Hochspannungselektrophorese notwendig wurde. Außerdem war hier leicht der basische bzw. saure Charakter einer Substanz zu erkennen. Dazu wurden die gefällten Substanzen in wenig 0,1 m Formiat Pufferlösung pH 3,5 - 4,0 gelöst und mittels

Glaskapillare auf einen in Puffer getränkten Filterpapierstreifen von 43 cm Länge und 10 cm Breite auf einer Startlinie aufgetragen. Die nassen Papierstreifen wurden mit einer Glasplatte (nicht berührend) abgedeckt und an beide Enden für 60 -70 min eine Spannung von 1 - 1,2 kV angelegt. Eine thermostatisch geregelte Alkohol-Kühlung wurde so eingeregelt, daß weder die nassen Papierstreifen gefroren noch die Flüssigkeit verdunstete und die Gefahr des Verbrennens des Papiers bestand. Dieser Punkt lag bei -14° - -16° C. Ferner wurde die Wärmeverlustleistung pro Streifen auf 30 bis max. 35 Watt gehalten. Nach Abschalten des Stromes wurden die Papierstreifen im kalten Luftstrom getrocknet und die Substanzflecken unter UV-Licht markiert. Nach dem Dokumentieren durch Photo-Print wurden die Areale ausgeschnitten und wie bei der Papierchromatographie eluiert.

G. Identifizierung der Substanzen

1. Aufzeichnen der UV-Spektren

Die so aufgearbeiteten Substanzen wurden einer spektrophotometrischen Untersuchung unterzogen. Es wurden die Spektren bei verschiedenen pH-Werten an einem Beckman- Photometer Typ DK2-A aufgenommen.

2. Enzymatische Hydrierbarkeit der Nucleotide

Wie eingangs gesagt, besitzen natürliche Pyridinnucleotide die Fähigkeit, in Stellung 4 des Pyridinringes 2 Wasserstoffatome aufzunehmen. Dieses wurde mit Hilfe von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase an den behandelten Nucleotiden geprüft. Reaktionsansatz wurde nach Coper (33) durchgeführt und am DK2-Photometer graphisch festgehalten.

3. Komplexbildung mit KCN

Auch die Fähigkeit der Nucleotide, mit CN^- -Ionen Komplexe zu bilden, die sich in Änderungen der Extinktion bei 325 nm zeigt, wurde geprüft (34).

4. Aufzeichnung der IR-Spektren

Von entsprechenden Substanzen wie NAD bzw. NADP, 6-AN, Nikotinamid, 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid bzw. dessen N-Methyl-Derivat wurden IR-Spektren aufgezeichnet. Alle Substanzen wurden vorher im Vakuumexsikkator über Silikagel 2 Tage getrocknet, mit KBr verrieben und an einem Perkin-Elmer-Gerät gemessen. (Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Lindemann von der Analytischen Abteilung des Pharmazeutischen Instituts der Freien Universität Berlin durchgeführt.)

Es wurden von den Basen ,die durch milde alkalische Hydrolyse aus dem synthetisierten Nucleotid gewonnen wurden (35), ebenfalls die IR-Spektren aufgezeichnet, so daß ein Vergleich mit den Ausgangsbasen möglich war.

5. Phosphatbestimmung nach Berenblum und Chain (36)

Der Phosphatgehalt der in den einzelnen Banden auftretenden Substanzen wurde zu deren Identifizierung nach einer Methode von Berenblum und Chain durchgeführt (36). Das Prinzip der Methode liegt in der vollständigen Extrahierbarkeit der Heteropolysäure Phosphorwolframat mit i-Butanol. Der in organisch gebundener Form vorliegende Phosphor wird durch Veraschung mit 1 ml 10N HClO_4 bei 170° - 180°C in anorganisches Phosphat verwandelt. Die völlig klare, farblose Lösung wird in einen Scheidetrichter von 50 ml Inhalt gefüllt und nach Zugabe von 2,5ml 5%iger Ammoniummolybdatlösung mit Aqua dest. auf 10 ml gebracht. Anschließend wird durch zweiminütiges Schütteln mit 10ml i-Butanol extrahiert. Die

wässrige Phase wird abgetrennt und der alkoholische Extrakt zweimal mit je 5 ml in H_2SO_4 gewaschen. Jetzt werden 15 ml SnCl_2 -Lösung (frisch bereitet aus 40% iger SnCl_2 -Lösung und in H_2SO_4 , 1:200) zugesetzt und weiter 30 sec. geschüttelt, wobei die Phosphormolybdänsäure zu einem blaufärbten Mischoxyd reduziert wird. Die wässrige Phase wird wieder abgelassen und die alkoholische Phase quantitativ in einen 25 ml-Meßkolben überführt und mit Aethanol bis zur Marke aufgefüllt. Als Eichlösung diente eine Lösung von KH_2PO_4 in einer Konzentration von 1 $\mu\text{Mol/ml}$ Phosphat. Die Extinktion der Lösungen wurde an einem Beckman-Photometer Typ DB bei 725 nm gemessen. Eichkurve s. Abb. 7

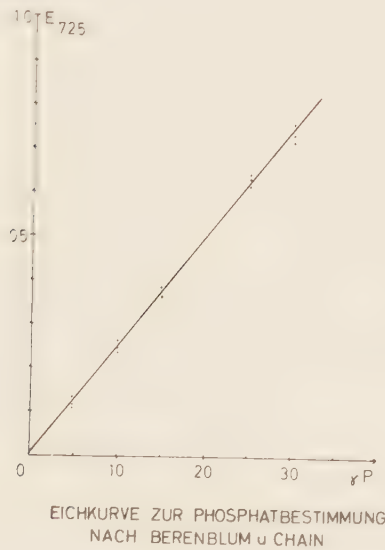


Abb. 7

Eichkurve zur Bestimmung von Phosphat nach Berenblum und Chain (36) Eichlösung: KH_2PO_4 1 $\mu\text{Mol/ml}$

6. Phosphatbestimmung nach Fiske und Subbarow und Bartelett

Da bei der vorhergehenden Methode leicht Fehler durch undichte Trichter auftraten, wurde parallel dazu eine Bestimmung des organisch gebundenen Phosphors nach Fiske, Subbarow und Bartlett durchgeführt (37,38). Der organisch gebundene Phosphor wurde in Reagenzgläsern, die mit einer Ringmarke bei 5 ml versehen sind, nach Zusatz von 0,7 ml Veraschungsreagenz (Mischung gleicher Volumina 60% iger HClO_4 und 96% iger H_2SO_4) langsam verascht. Der Veraschungsvorgang ist mit Sicherheit beendet, wenn die vorübergehend farblos gewordene Veraschungsflüssigkeit infolge Abspaltung von freiem Chlor eine gelbgrüne Färbung annimmt. Anschließend werden 4 ml 1%ige Ammoniummolybdatlösung und 2 ml Reduktionsreagenz (Lösung von 0,25 g 1-Amino-2-Hydroxynaphthalin-4-Sulfonsäure und 1 g Na_2SO_3 in 100 ml einer 15% igen wässrigen Lösung von Natriumpyrosulfit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) zugesetzt. Danach wird mit Aqua dest. auf 5 ml aufgefüllt. Nach gründlichem Mischen werden die Gläser 10 min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung wird die Intensität der entstandenden Blaufärbung bei 820 nm bestimmt.

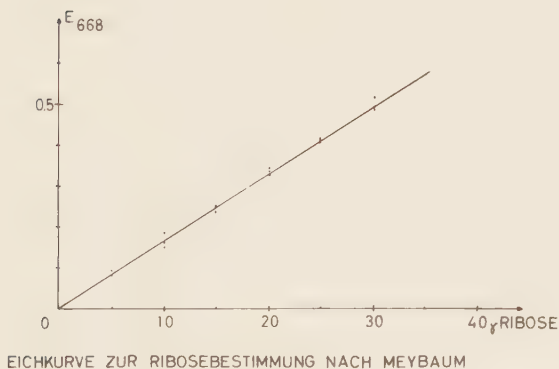
Die beschriebene Arbeitsweise erlaubt die genaue Bestimmung von 0,1 - 20 μg Phosphor in einem Reaktionsansatz von 5 ml. Bei der Wellenlänge von 820 nm und einer Schichtdicke von 10 mm ergibt 0,1 μMol Phosphat (= 3,1 $\mu\text{g P}$) in 5 ml Reaktionsvolumen eine Extinktion von 0,540 (gemessen im Spektralphotometer Zeiss PMQ 2).

7. Ribosebestimmung nach Meybaum (39)

Die Bestimmung des Riboseanteils, der in den Banden auftretenden Substanzen wurde kolorimetrisch nach einer Methode. von Meybaum (39), die von Barnum und Mitarbeitern (47) verbessert wurde, durchgeführt.

Dazu diente eine frisch zu bereitende Lösung aus 0,4 g Orcin p.a. , 1 ml FeCl_3 -Lösung (4%ig) und 36% ige HCl ad 100 ml. 1 ml der zu untersuchenden Lösung und 2 ml des beschriebenen Reagenzes wurden 15 min. lang im kochenden Wasserbad erhitzt, dann auf 20 ° C wieder abgekühlt. Bei Anwesenheit von Ribose färbte sich die Lösung je nach Gehalt gelbgrün bis dunkelgrün. Die Extinktion der Lösung wurde bei 668 nm am Beckman-Photometer DB gegen Wasser gemessen. Als Eichlösung diente eine Vergleichslösung von Adenosin in einer Konzentration von 15 μg Ribose/ml (0,1 $\mu\text{Mol/ml}$).

Eichkurve s. Abb.8



Abb, 8

Eichkurve zur Bestimmung von Ribose aus Nucleotiden nach
Meybaum Eichlösung: Adenosin 0,1 $\mu\text{Mol/ml}$

8. Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte der isolierten Substanzen wurden, soweit es möglich war, an einem elektrisch beheizbaren Metallblock mit Quecksilberthermometer unter mikroskopischer Betrachtung der Kristalle bestimmt. Die Temperaturerhöhung erfolgte manuell durch Regelwiderstand in der Nähe des zu erwartenden Schmelzpunktes mit 1 bis 2 °C/min.

9. Saure Hydrolyse

Die synthetisierten und gereinigten Substanzen wurden zur weiteren Identifizierung einer sauren Hydrolyse unterzogen. Dazu wurde 1 - 2 mg Substanz zusammen mit 1 ml 1N HCl in eine Glasröhrchen eingeschmolzen und 60 min. lang auf 120 °C im Trockenschrank gehalten. Hierbei werden die Pyridinnucleotide in zwei oder mehrere Anteile gespalten, deren einer Teil die Base Adenin enthält, während der andere Teil den Pyridin- oder Pteridinanteil darstellt. Durch anschließende Papierchromatographie und falls erforderlich auch Hochspannungselektrophorese lassen sich die Basen trennen und das Mengenverhältnis zueinander spektrophotometrisch durch ihre UV-Absorption bei 260 bzw. 280 nm in Relation setzen.

10. Alkalische Hydrolyse

Nach Kaplan, Colowick und Barnes (35) läßt sich die Ribosidbindung des Pyridinnucleotids durch milde alkalische Hydrolyse in ein Pyridinrest (Nikotinamid) und ARPPR(P) spalten. Beide Teile lassen sich aufgrund ihres unterschiedlichen Charakters (Nikotinamid = alkalisch, ARPPR(P) = sauer) durch Hochspannungselektrophorese trennen und anschließend spektrophotometrisch bestimmen.

Dazu wurde eine Probe NADP bzw. synthetisiertes Pyridinnucleotid mit 2,5 ml 0,1 n KOH versetzt, 5 min. lang auf 75°C im Wasserbad erwärmt. Danach Neutralisieren der Lösung am pH-Meter mit eiskalter 0,2 ml KClO_4 . Der KClO_4 -Niederschlag wurde durch Abzentrifugieren abgetrennt. Anschließend erfolgte die Fällung mit einem Alkohol-Aether-Gemisch (2:1), der Überstand wurde abgesaugt und der Niederschlag in wenig Formiatpuffer (0,15 m pH 3,5) gelöst und auf einen Papierstreifen aufgetragen, der an die Hochspannungselektrophorese angeschlossen wurde. Die dabei sich abtrennenden Basen wurden getrocknet und jeweils davon UV- und IR-Spektren aufgezeichnet.

H. Versuche der enzymatischen Synthese von NADP-Analogen in vivo

1. Versuch des enzymatischen Austausches von Nikotinamid im NADP gegen 6-Amino-Nikotinamid zur Testung der Glycohydrolase

10 männliche Wistar-Ratten von gleichem Gewicht (140-150 g) erhielten 50 mg/kg 6-Amino-Nikotinamid ip. Nach sechs Stunden wurden die Tiere dekapitiert, die Nieren herauspräpariert, entkapselt, gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff fixiert. Mit der sechsfachen Menge eiskalter Perchlorsäure (4% ig) wurden die gefrorenen Nieren am Ultraturrax 1 min. lang bei 23 000 U/min homogenisiert. Anschließend erfolgte das Abzentrifugieren in einer Servall-Kühlzentrifuge 30 min. bei 12 000 U/min und 0°C. Der gelbliche Überstand wurde im Eisbad unter Zusatz von 2 ml 0,2 m Trislösung mit 2n-KOH auf pH 7,2 gebracht, wobei KClO_4 als weißer Niederschlag ausfiel. Erneutes Abzentrifugieren 10 min. lang bei 5 000 U/min und 0°C erfolgte ebenfalls in der Kühlzentrifuge. Der klare, gelbe Überstand wurde nun auf eine inzwischen fertig beschichtete Anionenaustauschersäule Dowex 1 x 10 (Formiatform) gebracht und anschließend an den Gradientenelutionsapparat

angeschlossen, wobei mit ansteigendem Säuregrad mit Ameisensäure (beginnend mit 0,1 n HCOOH) eluiert wurde (s. auch Meth. C, S.8).

Dabei traten reproduzierbar folgende Banden auf:

1. NAD, 6-ANAD
2. 5'-AMP
3. GMP, NADP, 6-ANADP
4. ARIPR

Die Aufarbeitung der einzelnen Banden erfolgte nach Meth. D, S.9 und Meth. E, S.10.

Zur Bestimmung der natürlichen und falsch strukturierten Pyridinnucleotide wurden jeweils 50 - 100 µl einer definierten Lösung verwendet. Dabei fand eine auf Lowry et al. und Roberts & Kapphan (40,41) zurückgehende und von Neuhoff modifizierte Methode (42) Anwendung.

Bei Versuchen, die den Einbau des 6-Amino-Nikotinamids in die Pyridinnucleotide an der durch Folsäure geschädigten Niere in der Regenerationsphase klären sollte, bekamen 10 männliche Wistar-Ratten von ungefähr gleichem Gewicht (140-150 g) 500 mg/kg Folsäure (gelöst als Natriumfoliat) in die Schwanzvene unter Äthernarkose injiziert, die Kontrolltiere erhielten eine aliquote Menge Natriumbikarbonatlösung. Nach 96 Stunden, wonach in der Regel 10-15 % der Tiere gestorben waren, bekamen dieselben Tiere sowie auch die Kontrolltiere 50 mg/kg 6-Amino-Nikotinamid intraperitoneal (als Lösung in isotoner NaCl).

Die nach sechsstündiger Latenzzeit herauspräparierten Nieren wurden nach Meth. II, S.18 weiterverarbeitet.

I. Spektro-fluorometrische Bestimmung der natürlichen und der 6-AN-Pyridinnucleotide in den Nieren

Zur quantitativen Bestimmung der natürlichen und der 6-Amino-Nikotinamid enthaltenden Pyridinnucleotiden

wurde ein spektrofluorometrisches Verfahren von Herken und Neuhoff (42) angewendet, das nach Aufstellen einer Eichkurve die quantitative Messung von kleinsten Mengen 6-ANAD(P) bzw. NAD(P) nebeneinander zuläßt.

Die Anregungs- und Emissionsspektren sind bei verschiedenen pH-Werten so unterschiedlich, daß sich die Bestimmung ohne Schwierigkeiten durchführen ließ.

Als Apparatur diente ein Aminco-Bowman-Spektrofluorometer, als Schreibgerät wurde ein Moseley-Autograph verwendet. Die Bestimmung der 6-AN-haltigen Pyridinnucleotide erfolgte mit 50 - 100 µl Meßprobe und 0,2 ml 5n HCl, die nach 5 Minuten Erhitzen auf 100 Grad C im Wasserbad mit 2,0 ml

Aqua 4x dest. (Quarzapparatur) aufgefüllt wurde. (Das Maximum des Anregungsspektrums liegt bei 310 nm, die maximale Emission bei 390 nm.)

Die Bestimmung der natürlichen Pyridinnucleotide erfolgte mit 50 - 100 µl Probe und 6n NaOH, die ebenfalls nach 5 Minuten Erhitzen auf 100 Grad C im Wasserbad mit 2,0 ml Aqua 4x dest. aufgefüllt wurde. (Das Maximum des Anregungsspektrums liegt bei 365 nm, die maximale Emission bei 480 nm.)

Eichkurven und Anregungsspektren von 6-AN, 6-ANAD(P) und NAD(P) bei verschiedenem pH siehe Abb. 9, 10 und 11.

Der Gehalt der Fraktionen wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$K = F \times \frac{\text{Fraktionsvolumen}}{\text{Reaktionsvolumen}}, \text{ dabei ist}$$

$$F = \text{Fluoreszenz} = \frac{(\text{Meßwert} - \text{Leerwert}) \times \text{Meßvolumen}}{\text{Apparateverstärkung}}$$

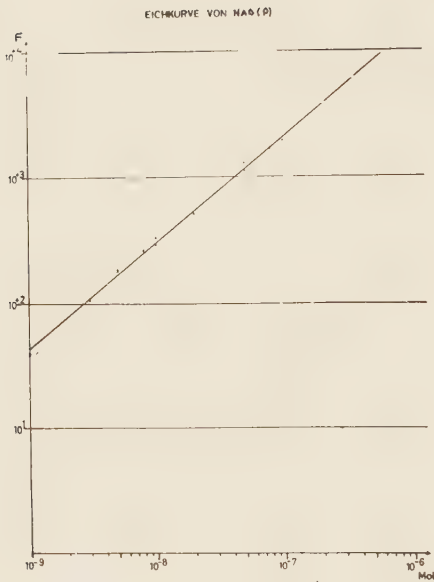


Abb.9

Eichkurve der spektrofluorometrischen Bestimmung
von NAD(P)

Eichlösung 0,1 μ Mol NADP/ml

Gemessen am Aminco-Bowman-Spektrofluorometer

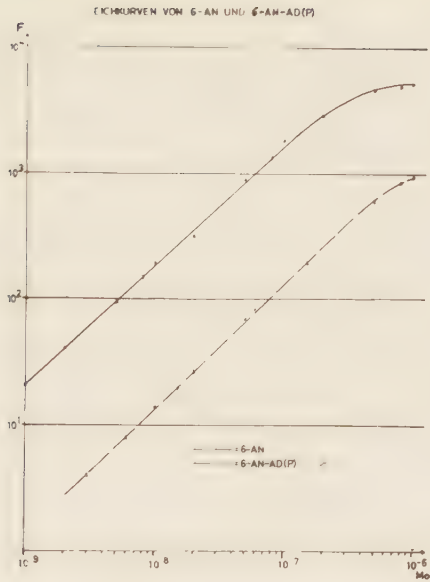


Abb. 10

Eichkurve der spektrofluometrischen Bestimmung von
6-AN und 6-ANAD(P)
Eichlösung 6-ANAD(P) 0,1 μ Mol/ml

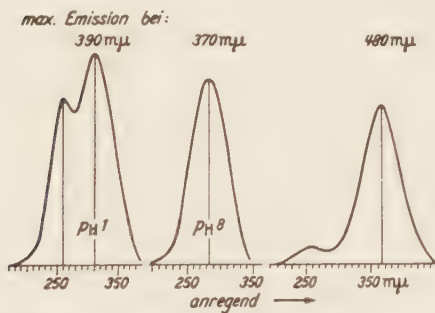


Abb. 1. Anregungsspektren von 6-Aminonicotinsäureamid,
6-ANAD und 6-ANADP bei verschiedenem pH. Zum Ver-
gleich rechts das Spektrum von NAD

Abb. 11

Anregungsspektren von 6-AN, 6-ANAD(P) und NAD(P)
nach Herken und Neuhoﬀ (42)

J. Diureseversuch an der Infusionsmaschine nach
Herken, Senft, Schwarz, Merker (68)
(Maschine konstruiert und erbaut von Herrn
Dietz, Pharmak. Inst. FU Berlin)

1. Bestimmung des Glucuronidgehalt des Harns

Insgesamt 10 männliche Wistar-Ratten wurden je in einem Plastik Käfig gehalten, der eine getrennte Harn- und Stuhlsammlung erlaubt. Die Schwänze der Tiere hängen dabei ins Freie, so konnte in die Schwanzvene eine Kanüle geschoben werden, die an einem Polyäthylenschlauch angesetzt war. Dieser Schlauch war über ein Rückschlagventil an den Infusionsapparat angeschlossen, der durch eine Walkpumpe in jedem der insgesamt 10 Schläuche eine konstante Menge von 5 ml Infusionslösung pro Stunde drückte. Die Infusionslösung enthielt 0,2% NaCl, durch Zusatz von Glucose (4,3 g/100ml) isotonisch gemacht. Die Käfige befanden sich alle in einem von Plexiglas umschlossenen Raum, der gleichmäßig beheizt (28°C), beleuchtet und belüftet wurde. Der Urin wurde je Tier halbstündlich bis stündlich in Meßzylindern gemessen und in Reagenzgläser gefüllt, die bis zur Weiterverarbeitung kühl aufbewahrt wurden.

Die nach J 1 vorbereiteten Tiere wurden ca. 5-6 Stunden zur Erreichung eines " steady state " ohne zusätzliche Behandlung in der Infusionsapparatur gelassen. Dann bekamen 5 Tiere 50 mg/kg 6-Amino-Pyridin-3-Carboximid (gelöst in Aqua dest.), die Kontrollen zusätzlich etwa die gleiche Menge Infusionslösung durch die Schwanzvene verabfolgt. Die Urinabnahme erfolgte alle 30 Minuten. Die so erhaltenen Proben wurden mit Aqua dest. 1:10 verdünnt und der Glucuronsäurebestimmung zugeführt.

Zur quantitativen Bestimmung der Glucuronsäure im Harn wurde die Carbazol-Reaktion nach Dische (43,44)

angewendet. Dazu wurden 0,5 ml des mit dest. Wasser 1: 10 verdünnten Harns in ein Reagenzglas pipettiert, in Eiswasser abgekühlt, und tropfenweise unter ständigem Umschütteln mit 3 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Anschließend wurde das Gemisch im kochenden Wasserbad 20 Minuten lang erhitzt. Ein am Reagenzglas angebrachtes Zwischenblech diente als Deckel für das Wasserbad und verhinderte eine Kondensation von Wasserdampf an der Innenwand des Reagenzglases. Danach wurden die Reagenzgläser durch Eintauchen in Eiswasser abgekühlt und das Gemisch mit 0,1 ml einer 0,1%igen alkoholischen Carbazollösung (Merck) versetzt. Die entstehende Färbung erreicht ihr Maximum nach 2 Stunden und verändert sich nicht innerhalb der nächsten 4 Stunden. Zur Bestimmung der Leerwert-Extinktion wurden Urinproben hergestellt, in denen die Carbazollösung durch 0,1 ml Alkohol ersetzt wurde. Zur Herstellung der Eichkurve wurden 176 mg Glucuronsäurelacton (Merck) gleich 1m Mol eingewogen, in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Diese Ausgangslösung diente zur Herstellung einer Verdünnungsreihe, die aus der Abb. 12 zu erkennen ist.

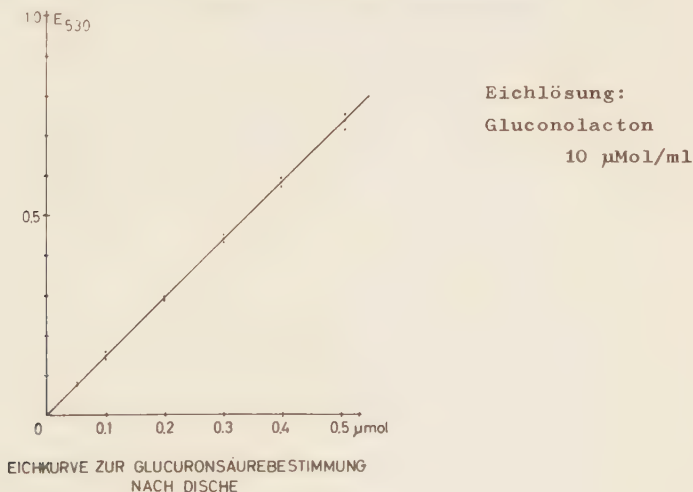


Abb. 12

2. Quantitative Bestimmung des 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamids im Harn

Die Bestimmung des 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamids welches über dem Harn ausgeschieden wurde, erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 261 nm aus 1:100 verdünnten Proben. Als Leerwert diente mit Aqua dest. 1:100 verdünnter Harn der Kontrolltiere. Die Messung wurde durchgeführt mit einen Beckman-Photometer DB.

3. Aufarbeitung des Rattenharns zur Papierchromatographie

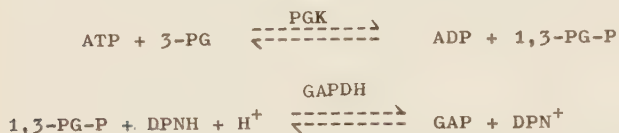
Zur Untersuchung, ob das Pyridinderivat 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid im tierischen Organismus eine Umwandlung erfährt oder ihn unverändert verläßt, wurde der Harn der behandelten Tiere gesammelt und zunächst mit Chloroform geschüttelt, danach am Büchi-Rotavapor eingeeengt bis fast zur Trockne und anschließend mit heißem Aceton extrahiert. Der Acetonauszug wurde auf dem Wasserbad bis auf ca. 1 ml eingeeengt und zur Papierchromatographie verwendet. Als Vergleiche dienten Blindharn der Kontrolltiere und Vergleichssubstanzen wie z.B. N-Methyl-6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Jodid.

K. Darstellung von N-Methyl-6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid

1 m Mol (152 mg) 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid wurden in 50 ml Aethanol-Methanol-Gemisch 1:1 (wasserfrei) gelöst und am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Dann wurde in Anteilen von 1 ml insgesamt 4 ml Methyljodid zugesetzt und 2 Stunden am Sieden gehalten. Die Lösung färbte sich von gelb nach braun. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung am Rotavapor (Büchi) auf ca. 15 ml eingeeengt, ohne ein Ausfallen einer Substanz zu beobachten. Jetzt wurde die braune Lösung in 100 ml absoluten Aether gegossen , wobei ein gelbes amorphes Pulver ausfiel, das sofort abgesaugt, mit absoluten Aether nachgewaschen und im Vakuumexikator über Silicagel getrocknet wurde. Das Pulver war sehr hygroskopisch und zerfloß an der Luft in wenigen Minuten. Um zu überprüfen, ob die Umsetzung quantitativ verlaufen war, wurde ein Papierchromatogramm angefertigt und in dem Lösungsmittelgemisch Butanol-Propanol-NH₃- H₂O (25/15/8/3) entwickelt. Beim Betrachten im UV-Licht (254 nm) ergab sich eindeutig ein neuer Substanzfleck mit dem RF-Wert: 0,17, während die Ausgangssubstanz selbst einen RF-Wert: 0,33 besitzt. Das Reinigen des Rohprodukts geschah mit Hilfe der Dickschichtchromatographie auf Glasplatten 20x20 cm, wobei eine Trägerschicht von Silicagel HF 254 (Merck) Verwendung fand. Das gereinigte Produkt zeigte leicht gelbliches Aussehen und einen Schmelzpunkt von 130-134°C. Als Literatur diente (45).

L. Enzymatische ATP-Messung in der Niere nach Gaben
von 6-Amino-Nikotinamid und Folsäure

Zur Messung des ATP-Gehaltes wurde eine enzymatische Methode benutzt, die von Beyer, Slin, Colowick und Cori (1946) vorgeschlagen wurde (46).



Da das Gleichgewicht der Reaktionsfolge auf der Seite des DPN liegt, ist die durch DPNH-Verbrauch verursachte Extinktionsabnahme ein Maß für die Konzentration des ATP.

Die nach Meth. H 1 aufgearbeiteten Nierenextrakte wurden auf gleiches Volumen gebracht mit Aqua dest. und davon jeweils eine Probe von 0,2ml der ATP-Messung zugeführt. Verwendet wurde eine Test-Combination TC-J der Firma Boehringer Mannheim. Die Messung erfolgte in einem Eppendorf-Photometer in Quarz-Küvetten (Schichtdecke 1 cm bei einer Wellenlänge von 366 nm). Zur Aufstellung einer Eichkurve diente eine ATP-Lösung (Boehringer) mit einer Konzentration von 1 mg ATP-Na₂ x 3 H₂O / ml (s.Abb.13 S.28).

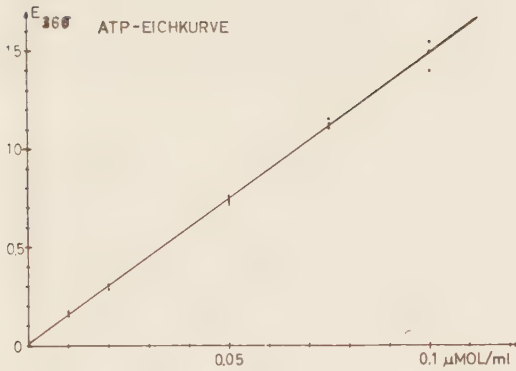


Abb. 13

Eichkurve zur enzymatischen Bestimmung von ATP

Eichlösung: $\text{ATP} \cdot \text{Na}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 $\mu\text{Mol/ml}$

Testkombination TC-J (Boehringer Mannheim)

III. ERGEBNISSE

A.1. Versuche über den enzymatischen Einbau des 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridins in NADP in vitro

Zunächst sollte geprüft werden, ob das leichter lösliche 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin (Strukturformel s. Abb. 14) ein abnormes Nucleotid durch enzymatische Austauschreaktion mit Hilfe der Nucleosidase in vitro zu bilden vermag. Dazu wurde ein Reaktionsansatz nach Methodik II/C zusammengestellt und derselbe zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert. Nach Inaktivierung des Enzymproteins durch zweiminütiges Erhitzen auf 96°C wurde der klare, gelbe Überstand durch lineare Gradientenelution mit Ameisensäure aufsteigender Konzentration in Fraktionen aufgetrennt (s. Abb. 15). Die in diesen Fraktionen enthaltenen Reaktionsprodukte wurden durch Gefriertrocknungen nach Methodik II/D vom Lösungsmittel befreit und dann durch Papierchromatographie, wobei das Lösungsmittelgemisch 1 : Isobuttersäure, Ammoniak, Wasser / 57:4:39, Anwendung fand, weiter aufgetrennt. Die dabei auftretenden Banden wurden mit 1 und 2 bezeichnet. Durch Vergleichssubstanzen wurde die Bande 1 als 5'-AMP neben wenig NADP identifiziert (s. Abb. 16).

Die Bande 2, welche zunächst den gleichen RF-Wert wie die Vergleichssubstanz NADP besaß (s. Abb. 18), unterschied sich von NADP dadurch, daß sie nicht hydrierbar war, da nach einer Elution dieser Bande 2 mit Wasser und Aufnahme des UV-Spektrums bei gleichzeitiger Reduktion mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kein zweites Maximum des Spektrums bei 340 nm auftrat (s. Abb. 19). Es mußte zunächst darauf geschlossen werden, daß es sich bei der Bande 2 im vorliegenden Versuch um eine enzymatisch nicht hydrierbare, adenin-

haltige Substanz ($E_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$) handeln mußte. Das abhydrolysierte Nikotinamid tritt nach der Gradientenelution mit Ameisensäure nicht mehr in dieser Fraktion auf, weil es als basische Substanz bereits mit dem Waschvorgang vor der Elution aus dem Gemisch der Reaktionsprodukte entfernt wurde.

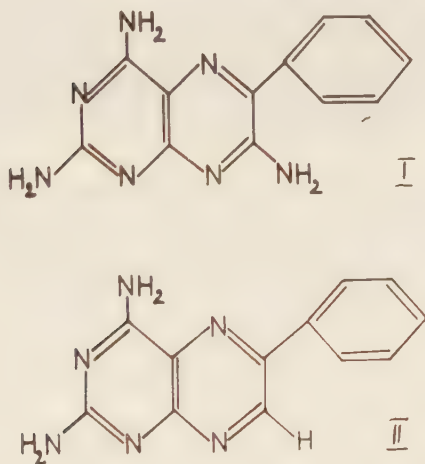


Abb. 14

Strukturformeln : I 2,4,7-Triamino-6-Phenyl-Pteridin (Triamteren)
 II 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin

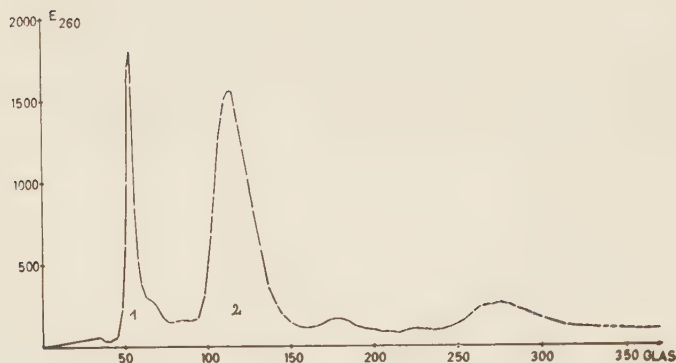
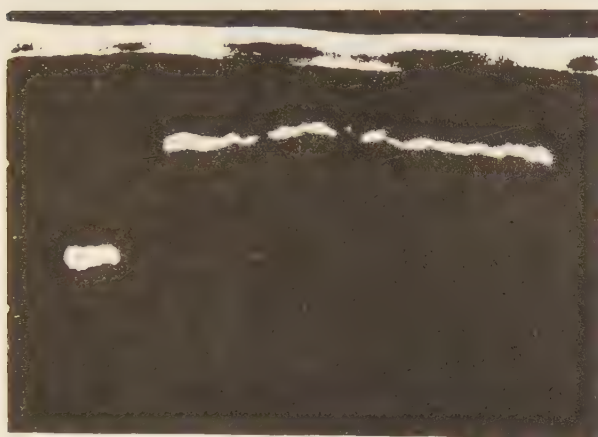


Abb. 15

Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin als Antimetabolit nach Einwirkung der Nucleosidase aus Rattenmilz-Mikrosomen in vitro. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat-Form
Elutionsmittel: 4n Ameisensäure, Fraktionsvolumen: 5 ml/Glas



NADP

BANDE 1

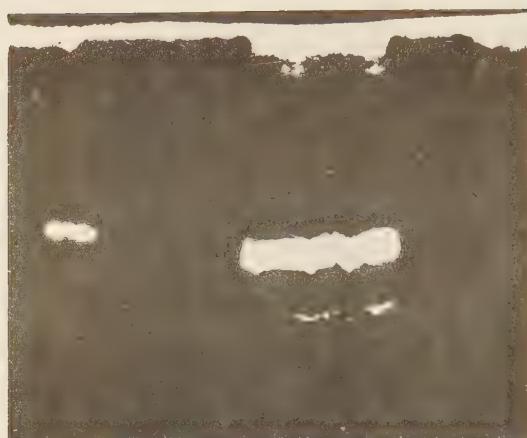
LAUFMITTEL 1

Abb. 16

Papierchromatogramm der Fraktion 1 des Versuches zur Darstellung eines NADP-Analogen in vitro mit 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin als Antimetabolit.

Vergleichssubstanz: NADP

Lösungsmittelgemisch: Isobuttersäure, Ammoniak, Wasser/
57:4:39



5'-AMP

BANDE 1

LAUFMITTEL 1

Abb. 17

Papierchromatogramm der Fraktion 1 des Versuches zur Darstellung eines NADP-Analogen in vitro mit 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin als Antimetabolit.

Vergleichssubstanz: 5'-AMP

Lösungsmittelgemisch: Isobuttersäure, Ammoniak, Wasser/
57:4:39

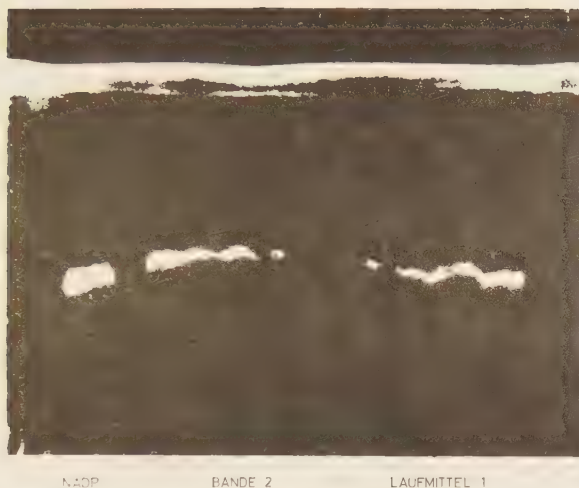


Abb. 18

Papierchromatogramm der Fraktion 2 des Versuches zur Darstellung eines NADP-Analogen in vitro mit 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin als Antimetabolit.

Vergleichssubstanz: NADP

Lösungsmittelgemisch: Isobuttersäure, Ammoniak, Wasser /
57:4:39

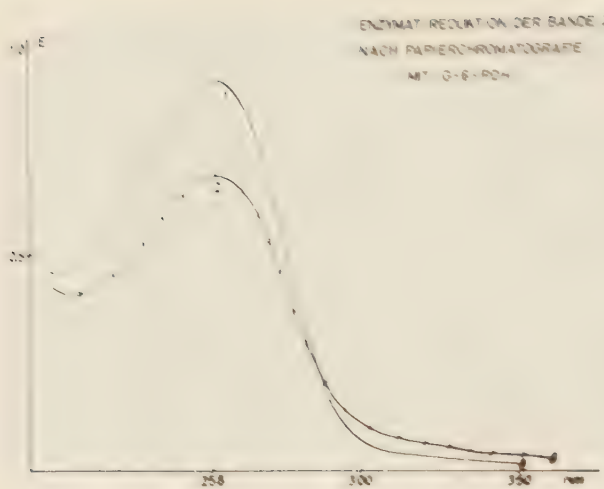


Abb. 19

UV-Spektrum der aus Fraktion 2 nach Papierchromatographie und Alkoholfällung isolierten Substanz
 1=Substanz bei pH 6,8 2=Substanz nach enzymatischer Reduktion mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

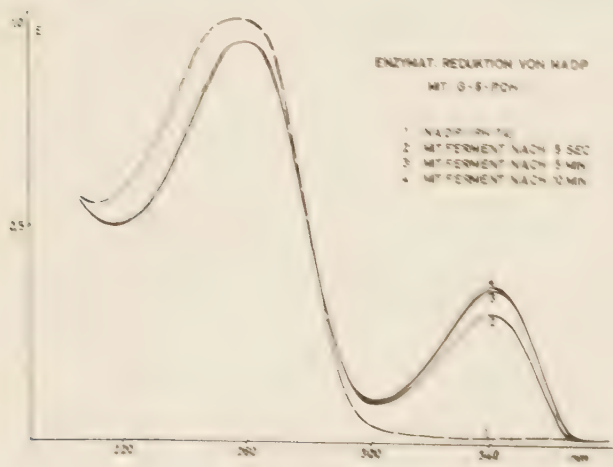


Abb. 20

UV-Spektrum von NADP (Boehringer)
 1=Substanz bei pH 6,8 2-4=Substanz nach enzymatischer Reduktion mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Nach wiederholter Papierchromatographie mit dem Lösungsmittelgemisch 2 (n-Propanol, Ameisensäure, Wasser /60:10:30) ließ sich aus der sonst einheitlichen Bande 2 eine fluoreszierende Nebenbande 2a abtrennen, die nach Elution mit n/100 HCl ein UV-Spektrum zeigte, wie Abb. 21 wiedergibt. Nach Vergleich mit dem UV-Spektrum des 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin schien es möglich zu sein, daß es sich um den zugesetzten Metaboliten handelte.

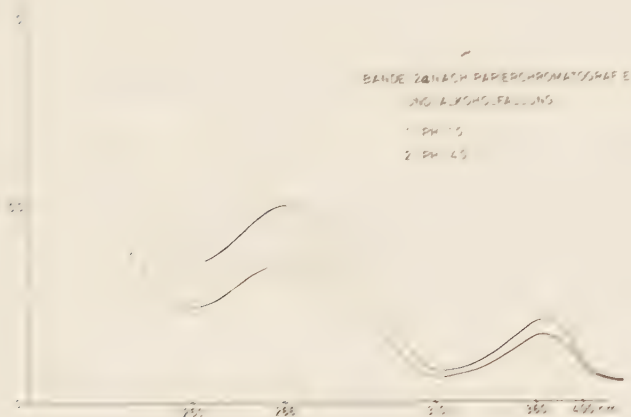


Abb. 21

UV-Spektrum der nach wiederholter Papierchromatographie isolierten fluoreszierenden Komponente 2a
1= Substanz bei pH 1,0 2= Substanz bei pH 14,0

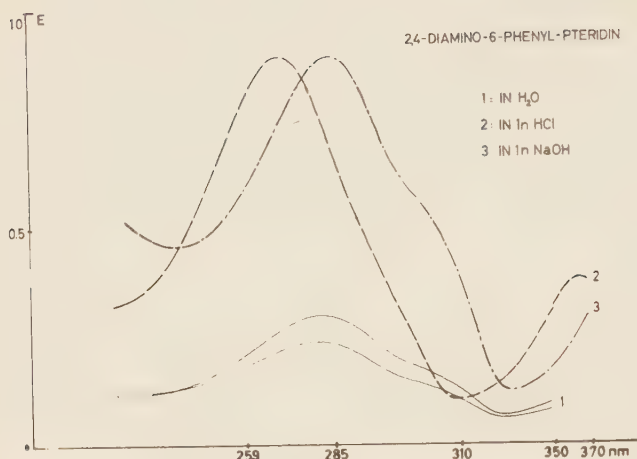


Abb. 22

UV-Spektrum des Antimetaboliten 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin bei verschiedenen pH-Werten

1=gelöst in Wasser 2=gelöst in 1n HCl
3= gelöst in 1n NaOH

Es wurde anschließend eine saure Hydrolyse mit ca. 2 mg der durch Fällung des Eluates der Bande 2 mit Alkohol-äther erhaltenen Substanz durchgeführt mit 1n HCl 120 Minuten lang bei 120°C im Bombenrohr. Durch Papierchromatographie des erhaltenen Hydrolyseproduktes konnte 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin neben Adenin als Spaltprodukte identifiziert werden.

Die nachfolgende Bestimmung des Ribose-Phosphat-Verhältnisses der Bande 2 ist in nachstehender Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I

Bestimmung des molaren Verhältnisses von Phosphat:
Ribose der aus Fraktion 2 isolierten Substanz

Eine Lösung AMP, NADP und isolierte Substanz mit der
 $E_{260} = 1,0/\text{ml}$ enthält: Mol.-Verhältnis

	γP	γRibose	B:	P:	R:
AMP $E_{260}=1,0/\text{ml}$	6,2	31,9	1	1	1,02
NADP " " "	18,2	48,0	1	2,98	1,6
aus Frakt.2 isol. Subs. $E_{260}=1,0/\text{ml}$	16,7	43,7	^{*)} 1 _{**)1}	2,7 2,75	1,94 1,61

*)bezogen auf AMP, **) bezogen auf NADP

Um aussagen zu können, ob es sich bei der aus Bande 2 isolierbaren Substanz um eine einheitliche Verbindung oder etwa um ein Substanzgemisch handelt, wurde eine Hochspannungselektrophorese nach Methodik II/F damit durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Auftrennung der papierchromatographisch einheitlichen Bande in 3 Substanzen, die nach Elution mit Wasser und anschließender Aufnahme der UV-Spektren bzw. nach Papierchromatographie als 5'-AMP und 2', 5'-ADP und 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin identifiziert wurden (s. Abb. 23).

Die Analyse des Versuches der enzymatischen Synthese mit Hilfe der Nucleosidase eines abnormen Nucleotids bei dem anstelle des Nikotinamids der Pteridinkörper 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin vorliegt, ergibt zusammengefaßt folgende Befunde: 1. Die Ionenaustauschchromatographie des enteweißten Ansatzüberstandes ergab nach saurer ansteigender Gradientenelution einen Nikotinamid-haltigen Vorlauf, eine als 5'-AMP neben wenig NADP identifizierte Fraktion bzw. Bande 1 und eine weitere bei höherem Säuregrad eluierbare Fraktion 2.

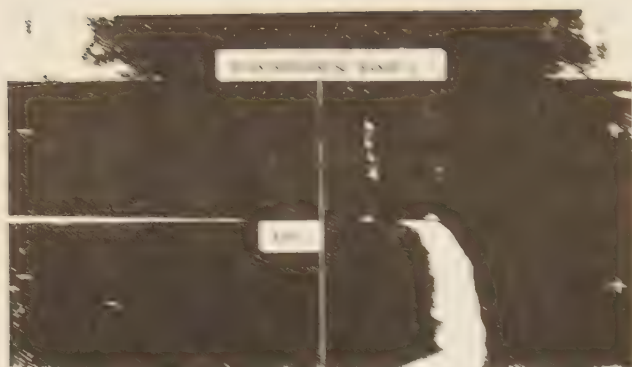


Abb. 25

unterschied der Elektrodenoberfläche von aus der Wand 2
bestehenden Substanz mit gleichem σ -Wert wie NaCl
elektrolyt: 1. im Formisoleffekt, bei 0,3
Elektrodenoberfläche: 1 und 2

Zeit: 60 min

Vergleichsbestand: 1-1-1-1-1

1,4-Diamino-2-phenyl-teridin ist auf der Kathodenoberfläche nicht
sichtbar, da Elektrodenoberfläche Substanz mit dem Photo-
druck-Verfahren in geringen Konzentrationen nicht er-
fahbar sind. Die der Elektrode benachbarte Wand auf der
Kathodenseite wurde durch Elektrodenoberfläche als 1-1-1-1-1
bezeichnet.

NaCl ließ sich in einer der Elektroden 2 nicht nach-
weisen, wie nach 10 min.

- a) den gleichen σ -Wert wie NaCl.
- b) ließ sich nicht optisch nachweisen.
- c) ließ sich durch Elektrodenoberfläche in eine Elektrodenoberfläche
und eine Kathode zerlegen.
- d) ließ sich durch Elektrodenoberfläche in die
1 Elektroden 1-1-1-1-1 und 1,4-Diamino-2-
phenyl-teridin zerlegen.

Nach saurer Reduktion der Wand 2 ließen sich diese.

und 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin durch Vergleichs-UV-Spektrographie nachweisen. Weiterhin enthielt das Hydrolysat Ribose und Phosphat in molaren Verhältnissen von 1,9:2,7.

Es ergibt sich, daß eine Synthese eines NADP-Analogen unter den beschriebenen Bedingungen nicht erfolgt ist: Ein synthetisiertes Analoges hätte bei Hochspannungselektrophorese homogen bleiben müssen. Das Elektropherogramm zeigte dagegen 5'-AMP, 2,5'-ADP und 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin. Dieser elektropherographische Befund weist zusammen mit dem Ergebnis der sauren Hydrolyse der NADP-ähnlichen Fraktion auf das Vorliegen einer adsorptiven Bindung zwischen dem eingesetzten Antimetaboliten 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin und ARPPR(P) oder RPPR(P) hin, die sich papierchromatographisch als einheitliche Fraktion darstellen. Da die NADP-ähnliche Fraktion kein Nikotinamid enthält, ist sie nicht hydrierbar, weil der Wasserstoffaustausch am C-4 des Nikotinamids stattfindet. Das UV-Spektrum der durch wiederholte Papierchromatographie von der Hauptfraktion abtrennbare Bande 2a (s. Abb. 21) ist aufzufassen als ein möglicherweise Adenin-überlagertes Spektrum des 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridins, was der Vergleich mit dem UV-Spektrum der Reinsubstanz (s. Abb. 22) zeigt. Das nicht gespaltene neben 5'-AMP in Fraktion 1 der Ionenaustauschchromatographie auftretende NADP wurde spektroskopisch bestimmt und ergab aus zehn durchgeführten Messungen einen Mittelwert von 4,19 μ Mol. Die hydrolytische Aktivität der Nucleosidase scheint unter diesen Bedingungen durch Zusatz von 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin zumindest ihre synthetische Aktivität zu übertreffen.

A.2. Versuche über den enzymatischen Einbau des
2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridins in NADP in
vitro unter Zusatz verschiedener Lösungs-
vermittler

In den folgenden Versuchen sollte durch Änderungen der Versuchsbedingungen festgestellt werden, ob eine Möglichkeit bestand, durch enzymatische Austauschreaktion die Bildung eines abnormen Nucleotids unter Zusatz von 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin als A timetabolit in vitro zu erreichen.

Jazu wurden dem Reaktionsansatz, der wie unter A.1. beschrieben zusammengestellt war, Lösungsvermittler wie 1,2-Polyaethylenglykol, Tween 80 und Monomethylacetamid in geringer Konzentration zugesetzt. Die Auswertung der anschließenden Fraktionierung durch Ionenaustausch- und Papierchromatographie ergab prinzipiell die gleichen Ergebnisse wie die Versuche der enzymatischen Synthese eines abnormen Nucleotids ohne Zusatz von Lösungsmittlern. Die spektroskopische Messung des nicht hydrolysierten NADP-Anteils in der Fraktion 1 ergab Werte wie sie Tabelle II wiedergibt. In dieser Tabelle sind auch Versuche erfasst, bei denen Mikrosomenhomogenate von anderen Organen eingesetzt wurden.

Tabelle II

Übersicht über enzymatische Syntheserversuche von NADP-Analogen mit 2,4-Diamino-6-phenyl-pteridin als Antimetabolit (in vitro) unter Verwendung von Lösungsvermittlern mit verschiedenen Mikrosomenarten, eingesetzte NADP-Menge 52,2 μ Mol

Mikrosomenart	mg Protein-N	Lösungsverm.	Nicht gespa. NADP
Rattenmilz	5,5	---	4,19 μ Mol
Rattenmilz	5,5	1,2-Prop.-gl.	2,71 μ Mol
Rattenmilz	5,8	MMAA	5,35 μ Mol
Rattenmilz	5,6	Tween 80 [®]	4,84 μ Mol
Rattenleber	6,4	---	12,16 μ Mol
Rattengehirn	9,8	---	10,91 μ Mol
Schweinehirn	9,0	---	2,06 μ Mol

Inkubationszeit: 4 Stunden

1,2-Prop.-gl.= 1,2-Propylenglykol (Merck)

MMAA= Monomethylacetamid (Merck)

A.3. Versuche über den enzymatischen Einbau von
1,3 Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Hydroxy-Pteridin
und
1,3 Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Chlor-Pteridin
als Antimetabolite in NADP und in vitro

In weiteren Versuchen sollte festgestellt werden, ob Pteridine, die anstelle der Aminogruppen in 2-4-7-Stellung andere Substituenten besitzen, durch die Nucleosidase in vitro gegen das Nikotinamid des NADPs zu abnormen Nucleotiden ausgetauscht werden können. Dazu wurden die Versuchsbedingungen wie unter Methodik B gewählt und die größtmögliche Konzentration, das heißt, Lösung bis zum Bodensatz, Antimetabolit zugesetzt. Als Antimetabolite fanden 1.) 1,3-Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Hydroxy-Pteridin und 2.) 1,3-Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Chlor-Pteridin Anwendung (Strukturformel s. Abb. 24).

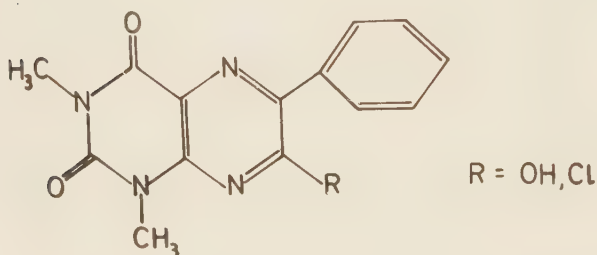


Abb. 24

Strukturformel der Antimetabolite

1. 1,3 Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Hydroxy-Pteridin
2. 1,3 Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Chlor-Pteridin

Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III

Antimetabolit 1-10 ⁻¹ molar	Inkuba- tions- zeit(h)	Protein- N mg/ Ansatz	Mikrosomen- art	Nicht ge- spaltenes NADP µ Mole	NADP Analo- ges
1,3-Dimethyl- 2,4-dioxo-6- phenyl-7-Chlor- pteridin MG. 302,5	3	6,4	Rattenmilz	2,3	-
1,3-Dimethyl- 2,4-dioxo-6- phenyl-7-Hydr.- pteridin MG. 284,1	3	25,5	Rattenmilz	4,22	-

Auch hier war es nicht möglich, ein abnorm strukturiertes Nucleotid zu synthetisieren, abgesehen davon, daß diese ohnehin sauren Charakter besitzenden Pteridine schlecht als Base im Austausch gegen Nikotinamid fungieren können.

A.4. Versuch der enzymatischen Synthese falsch struk-
turierter Pyridinnucleotide mit Pyridinderivaten
als Antimetabolite

Nachdem festgestellt wurde, daß mit den oben be-
schriebenen Pteridinen keine Nucleotidbildung möglich
ist, wurden Pyridinderivate auf ihre Fähigkeit der
Nucleotidbildung hin untersucht.

Für die Versuche wurden ausgewählt:

1. 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid
2. 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid
3. 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin

s. Abb. 25 S.44

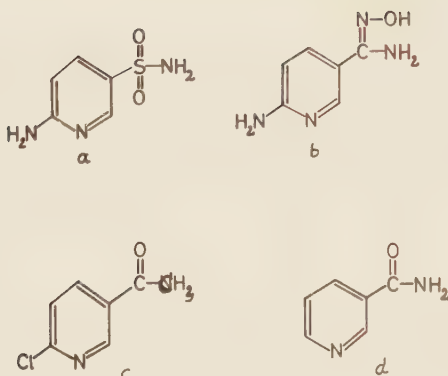


Abb. 25

Ausgewählte Pyridinanaloga (a-c) im Vergleich zum Nikotinamid (d)

a) 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid als Antimetabolit

Analog zu den Versuchen mit Pteridinderivaten wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

173,2 mg 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid = $1 \cdot 10^{-3}$ Mol wurden in 40 ml Phosphatpuffer von pH 6,6 unter Erwärmen gelöst, nach dem Abkühlen 40 mg NADP= 52,2 μ Mol zugesetzt und nach dessen Lösung 1,5 ml Rattenmilzmikrosomen (5,3 mg N/ml). Der gesamte Reaktionsansatz wurde 3 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Darauf wurde das Protein ausgefällt, abzentrifugiert und der Überstand durch Ionenaustauschchromatographie in seine Komponenten zerlegt. Wie Abb. 26 zeigt, ist hier nur eine große Bande zwischen Glas 40 und Glas 80 sichtbar (S.45). Durch Gefriertrocknung wurde diese Bande vom Lösungsmittel befreit und durch Papierchromatographie weiter gereinigt.

Wie Abb. 27 S.45 zeigt, bestand diese Bande zum größten Teil aus 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid. Ferner trat ein nicht näher untersuchtes Umwandlungsprodukt des Antimetabolits mit höherem RF-Wert auf.

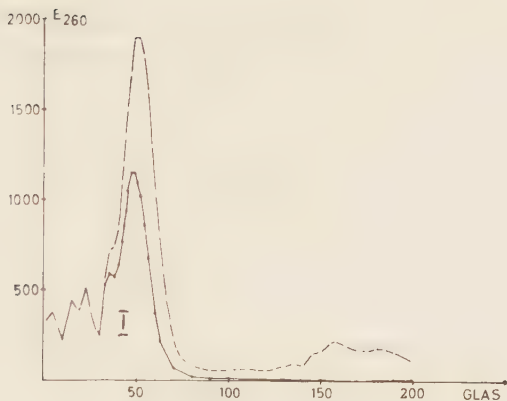


Abb. 26

Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid als Antimetabolit nach Einwirkung der Nucleosidase aus Rattenmilzmikrosomen in vitro. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat-Form
Elutionsmittel: 2n Ameisensäure, Fraktionsvolumen: 5ml/Glas

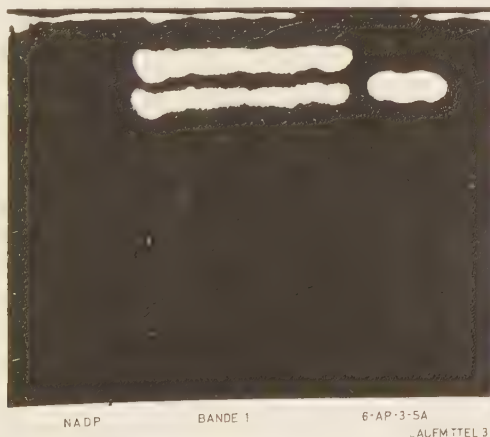


Abb.27

Papierchromatogramm der Fraktion 1 des Versuches zur Darstellung eines NADP-Analogen in vitro mit 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid als Antimetabolit. Vergleichssubstanzen: NADP und 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid, Fließmittel: n-Butanol, Aethanol, Ammoniak, Wasser/11:1:2:1

In der Fraktion 1 war nach Vergleichschromatographie und UV-Spektrographie weder NADP noch ein abnorm strukturiertes Pyridinnucleotid nachzuweisen.

b) 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin als Antimetabolit

Es wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

155,5 mg 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin wurden heiß in 40 ml Phosphatpuffer von pH 6,6 gelöst ($= 2,5 \cdot 10^{-5}$ molar), nach dem Erkalten 40 mg NADP darin gelöst ($= 1,25 \cdot 10^{-3}$ molar) und danach 2 ml Milzmikrosomen-suspension (5,4 mg N/ml) zugesetzt und 3 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Darauf wurde das Protein ausgefällt, abzentrifugiert und die überstehende Lösung durch Ionenaustauschchromatographie in ihre Komponenten zerlegt (s.Abb. 28).

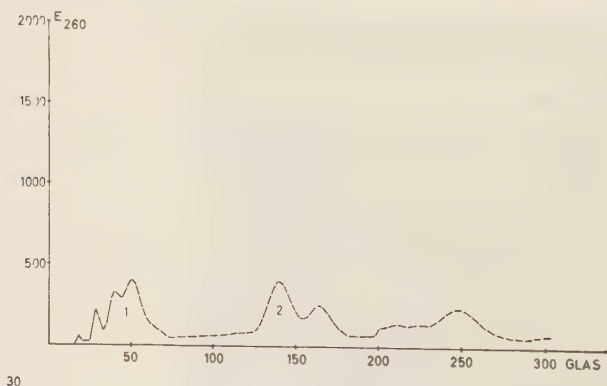


Abb.28

**Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin als Antimetabolit nach Einwirkung der Nucleosidase aus Rattenmilzmikrosomen in vitro. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat-Form
Elutionsmittel: 4n Ameisensäure, Fraktionsvolumen: 5ml/GLas**

Wie Abb. 28 zeigt, ergibt sich aus dem Elutionsdiagramm, daß zwei Fraktionen auftraten, Fraktion 1 bei Glas 50 und Fraktion 2 bei Glas 140. Durch Gefriertrocknung wurde aus beiden Fraktionen das Lösungsmittel entfernt, die erhaltenen Substanzen durch Papierchromatographie weiter aufgetrennt. Abb. 29 zeigt das Papierchromatogramm der Fraktion 1, wobei deutlich erkennbar ist, daß der auftretende Substanzfleck einen höheren RF-Wert als die Vergleichssubstanz NADP besitzt. Ferner ist an der Fließmittelfront der Substanzfleck des Antimetaboliten 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin sichtbar.

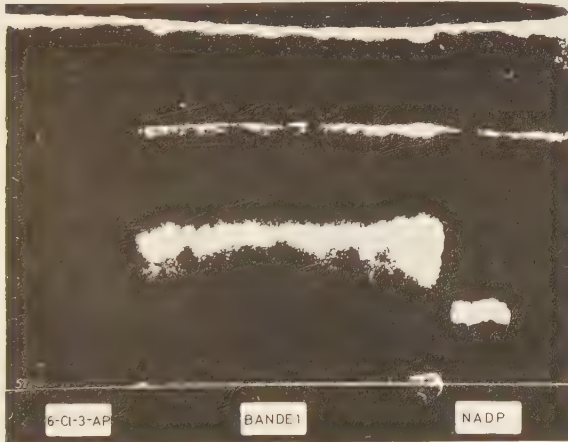


Abb. 29

Papierchromatogramm der Fraktion 1 des Versuchs der enzymatischen Darstellung eines NADP-Analogen mit 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin als Antimetabolit in vitro. Vergleichssubstanzen: NADP und 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin. Eluents: n-Propanol, Ameisensäure, Wasser / 60:10:30

Die durch Alkoholfällung aus Fraktion 1 isolierte Substanz wurde durch Vergleichschromatographie und UV-Spektrographie als ein Gemisch bestehend aus 5'-AMP und 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin identifiziert.

Die aus Fraktion 2 isolierte Substanz besaß im Vergleichschromatogramm (s. Abb. 30) einen höheren RF-Wert als die Vergleichssubstanz NADP und ließ sich enzymatisch nicht hydrieren . Sie konnte durch Vergleichschromatographie als 2'-5'-ADP, ein Spaltprodukt des NADPs identifiziert werden.

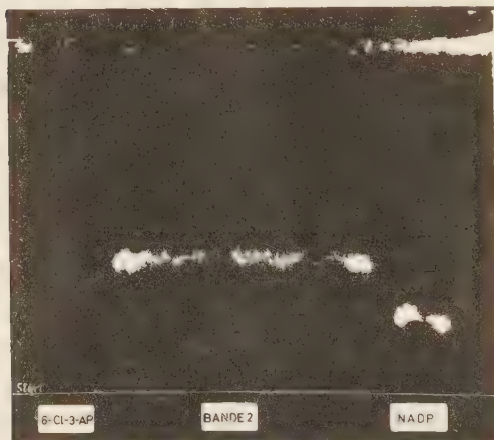


Abb. 30

Papierchromatographie der Fraktion 2 des Versuchs der enzymatischen Darstellung eines NADP-Analogen mit 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin als Antimetabolit in vitro. Vergleichssubstanzen: NADP und 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin. Eluiermittel: n-Butanol, Aethanol, Ammoniak, Wasser/ 11:1:2:1

NADP oder ein abnormes Pyridinnucleotid war in Fraktion 1 und in Fraktion 2 nicht nachweisbar.

c) 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit

Entsprechend den Versuchen 3a und 3b wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

152 mg 6-Chlor-3-Acetyl-Pyridin wurden 19 ml Phosphatpuffer pH 6,6 in der Hitze gelöst ($0,5 \cdot 10^{-1}$ molar), auf 20°C abgekühlt, 40 mg NADP ($= 2,5 \cdot 10^{-3}$ molar), darin gelöst und 3 ml Rattenmilzmikrosomensuspension (3,07 mg N/ml) hinzugefügt. Es wurde 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert, dann das Protein durch Erhitzen (2 Minuten, 96°C) ausgefällt, abzentrifugiert und der klare Überstand der Ionenaustauschchromatographie zugeführt (s. Abb. 31).

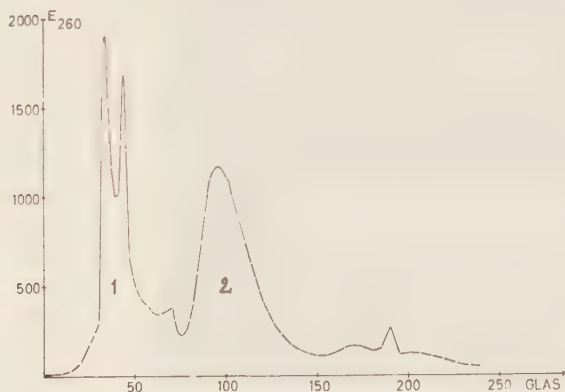


Abb. 31

Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit nach Einwirkung der Nucleosidase aus Rattenmilzmikrosomen in vitro.

Austauscher: Dowex 1x10 Formiat-Form

Elutionsmittel: 4n Ameisensäure, Fraktionsvolumen: 5ml/Glas

Wie aus Abb. 31 ersichtlich, treten zwei Hauptfraktionen auf. Durch Gefriertrocknung wurde das Lösungsmittel entfernt und die in den Fraktionen enthaltenen Substanzen durch Papierchromatographie weiter aufgetrennt. Während sich Bande 1 als 5'-AMP und 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid identifizieren ließ, trat in der Fraktion 2 eine Substanz auf, die den gleichen RF-Wert wie die Vergleichssubstanz NADP besaß (s. Abb. 32). Nach Isolierung der in Fraktion 2 enthaltenen Substanz durch Elution der Papierareale mit Wasser und Alkohol-Aether-Fällung wurde zunächst das UV-Spektrum aufgenommen. Dabei zeigte sich zunächst eine Kurve mit einem eindeutigen Maximum bei 263 nm. Auf Zusatz von KCN bei pH 9,0 trat ein zweites, flaches Absorptionsmaximum bei 325 nm auf (s. Abb. 33).

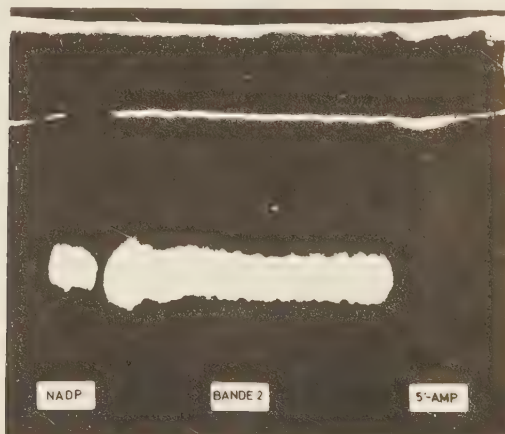


Abb. 32

Papierchromatogramm der Fraktion 2 des Versuchs der enzymatischen Darstellung eines NADP-Analogen mit 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit in vitro. Vergleichssubstanzen: NADP und 5'-AMP
Fließmittel: n-Propanol, Ameisensäure, Wasser /60:10:30

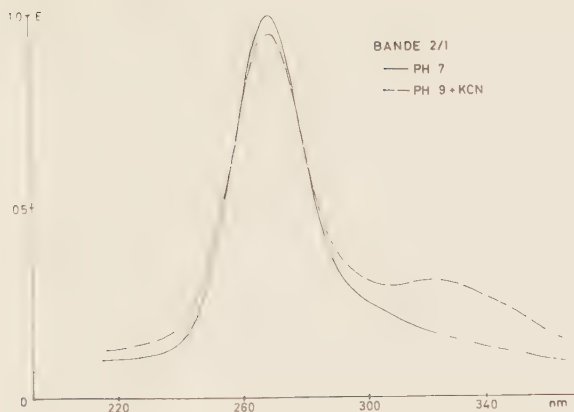


Abb. 33

UV-Spektrum der aus der Fraktion 2 isolierten Substanz des Antimetabolitversuches mit NADP und 6-Amino-Pyridin-3-Carboximid.

—: bei PH 7

- - -: bei PH 9 und KCN-Zusatz

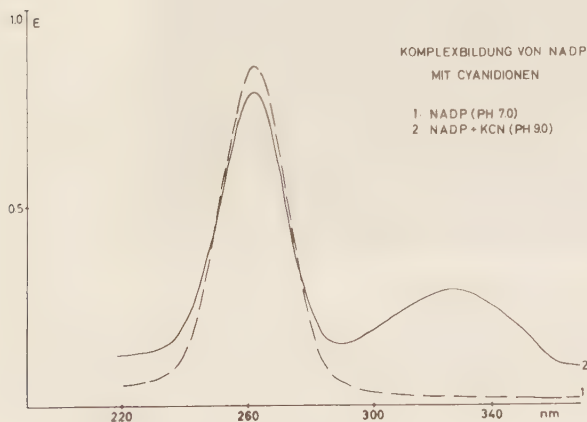


Abb. 34

UV-Spektrum von NADP (Boehringer)

1: Substanz bei PH 7

2: Substanz bei PH 9 und KCN-Zusatz

Beim Vergleich des vorliegenden UV-Spektrums der aus Fraktion 2 gewonnenen Substanz mit dem Absorptions-spektrum von NADP-Reinsubstanz (Boehringer) zeigten sich deutliche Unterschiede, die dafür sprachen, daß es sich bei dieser Fraktion 2 nicht um ausschließ-lich NADP handelte. Um festzustellen, ob neben NADP eine zweite Verbindung vorlag, wurde eine saure Hydrolyse nach Methodik G/9 angeschlossen. Nach-folgende Papierchromatographie des Hydrolyseproduktes aus Fraktion 2 läßt erkennen, daß neben Adenin und Nikotinamid, die als Spaltprodukte des NADPs aufzu-fassen sind, noch andere Spaltprodukte vorhanden waren, die sich jedoch durch Vergleichschromato-graphie nicht identifizieren ließen.

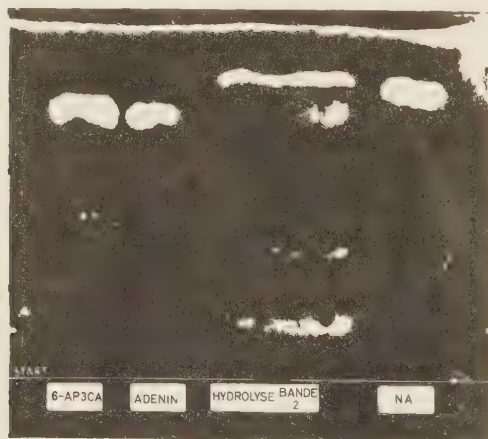


Abb. 35

Papierchromatogramm der aus Fraktion 2 des Versuchs der enzymatischen Darstellung eines NADP-Analogen mit 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid in vitro isolierten Substanz nach saurer Hydrolyse (in HCl/2h/120°C). Vergleichssubstanzen: 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid= 6-AP3CA, Adenin und Nikotinsäureamid= NA
Fließmittel: n-Butanol, Äthanol, Ammoniak, Wasser/11:1:2:1

Es wurde zur weiteren Identifizierung der neben NADP in Fraktion 2 vorliegenden Substanz eine Hochspannungselektrophorese nach Methodik II/F durchgeführt, sowohl mit Fraktion 2 als auch mit deren Hydrolyseprodukten. Die Auswertung der Elektropherogramme zeigte, daß auf der Anodenseite neben NADP eine zweite, deutlich erkennbare Absorptionsbande vorhanden war. Bei den Hydrolyseprodukten war zu erkennen, daß neben Adenin und Nikotinsäureamid auch die Base 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid vorlag, was die Existenz eines NADP-analogen Nucleotids vermuten ließ (s. Abb. 36 u. 37).

Es wurden von der aus Fraktion 2 isolierten Substanz und von NADP-Reinsubstanz Infrarot-Spektren aufgezeichnet (s. Abb. 38 u. 39), um eine eindeutige Identifizierung der auf dem Elektropherogramm (s. Abb. 36) der Startlinie am nächsten gelegenen Bande zu erhalten. Bedingt durch starke Überlagerung der OH-Gruppen (48) dieser Verbindungen im Bereich $2\ 500 - 3\ 500\text{ cm}^{-1}$ war eine Unterscheidung zwischen NADP und dieser neu aufgetretenen Bande direkt nicht möglich. Es wurde die in Fraktion 2 vorhandene und aus der neu aufgetretenen Bande im Elektropherogramm isolierte Substanz einer milden alkalischen Hydrolyse nach Methodik G/10 unterzogen und nach elektrophoretischer Trennung von den basischen, auf der Kathodenseite auftretenden Stoffen die Infrarot-Spektren aufgezeichnet (s. Abb. 41). Die Auswertung der erhaltenen Spektren ergab deutliche Unterschiede der Maxima bei $3\ 100 - 3\ 500\text{ cm}^{-1}$. Beim Vergleich dieser Infrarot-Spektren mit den Infrarot-Spektren des 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamids und des Nikotinamids (Reinsubstanz) (s. Abb. 42 u. 43) ließen sich die bei der alkalischen Hydrolyse abgespaltenen Basen bei der neu aufgetretenen Bande als 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid und bei der eingesetzten Vergleichssubstanz NADP als Nikotinamid identifizieren.

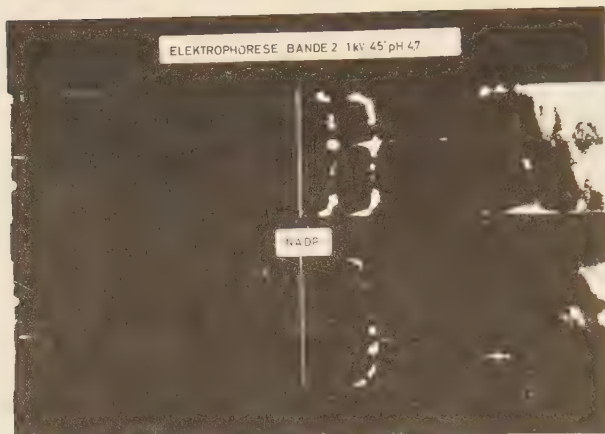


Abb. 36

Photoprint des Elektropherogramms der aus der eingeeengten Fraktion 2 des Antimetabolitversuchs in vitro mit NADP und 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid. Auftreten einer mit NADP nicht identischen dem Startpunkt näherliegenden Bande. Vergleichssubstanz: NADP, Elektrolyt: 0,1m Formiatpuffer, pH 4,7, Spannung: 1000 Volt, Laufzeit: 45 Minuten

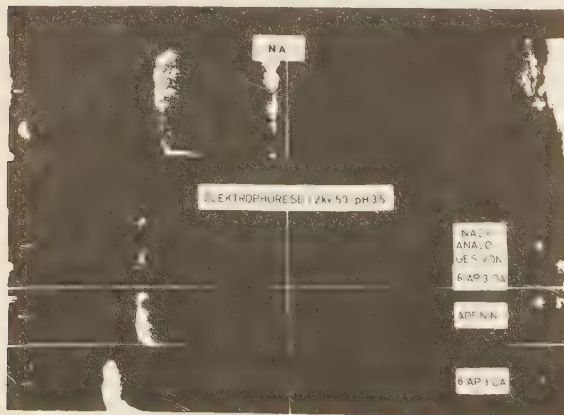


Abb. 37

Photoprint des Elektropherogramms der nach saurer Hydrolyse (1n HCl/1h/120°C) erhaltenen Produktes der Fraktion 2. Vergleichssubstanzen: Nikotinsäureamid= NA, Adenin und 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid= 6 AP3OA, Elektrolyt: 0,1 m Formiatpuffer pH 3,5, Spannung: 12 00 Volt, Laufzeit: 50 min

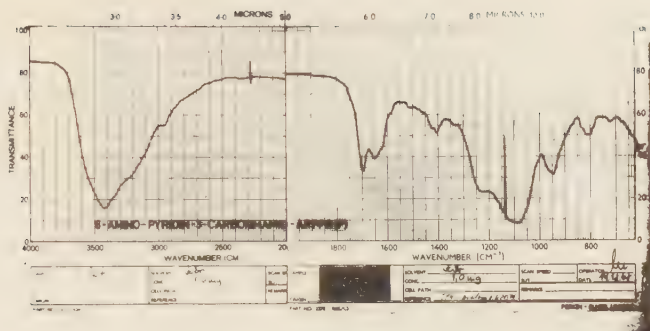


Abb. 38

IR-Spektrum von der aus Fraktion 2 des Versuches der enzymatischen Synthese eines NADP-Analogen mit 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit in vitro isolierten Substanz. Konzentration: 1,0 mg, Lösungsmittel: KBr

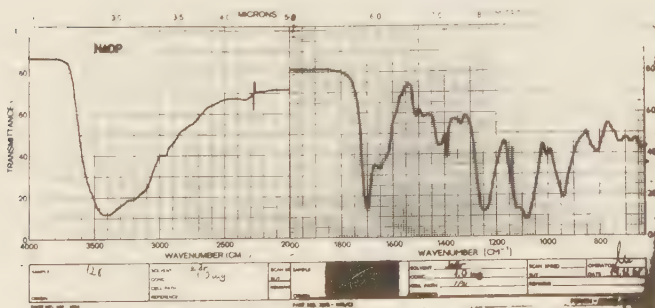


Abb. 39

IR-Spektrum von NADP-Reinsubstanz (Boehringer). Konzentration: 1mg, Lösungsmittel KBr

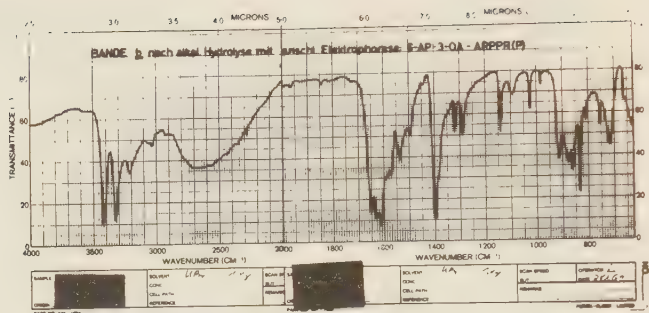


Abb. 40

IR-Spektrum der in Fraktion 2 vorhandenen und aus der neu aufgetretenen Bande im Elektropherogramm isolierten Substanz nach milder, alkalischer Hydrolyse und elektrophoretischer Trennung. Konzentration: 1mg, Lösungsmittel: KBr

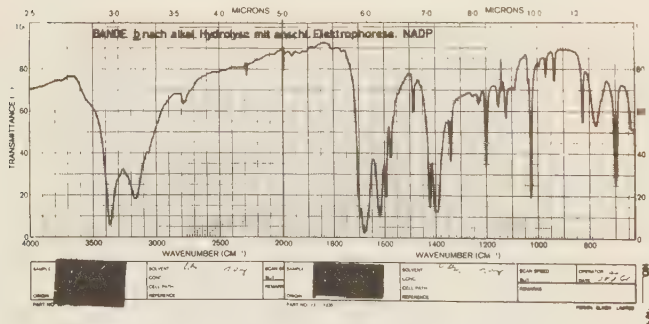


Abb. 41

IR-Spektrum der nach milder, alkalischer Hydrolyse und Elektrophorese isolierten, basischen Substanz aus NADP-Reinsubstanz. Konzentration: 1mg, Lösungsmittel: KBr

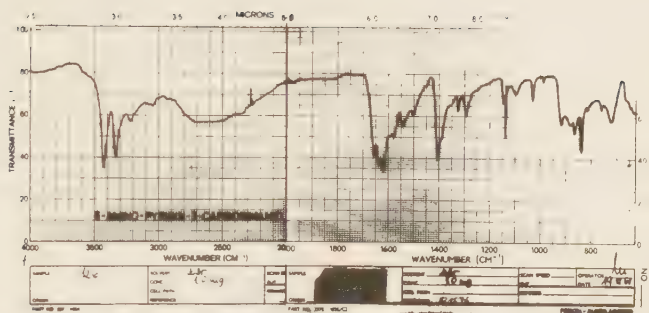


Abb. 42

IR-Spektrum von 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid (Boehringer Ingelheim). Konzentration: 1mg Lösungsmittel: KBr

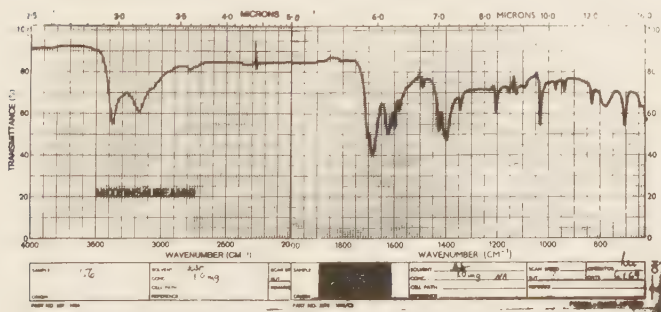


Abb. 43

IR-Spektrum von Nikotinsäureamid (Merck). Konzentration: 1 mg, Lösungsmittel: KBr

Die aus Fraktion 2 isolierte Substanz war mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase enzymatisch nicht hydrierbar, wie die UV-Spektren auf Abb. 43 a zeigen.

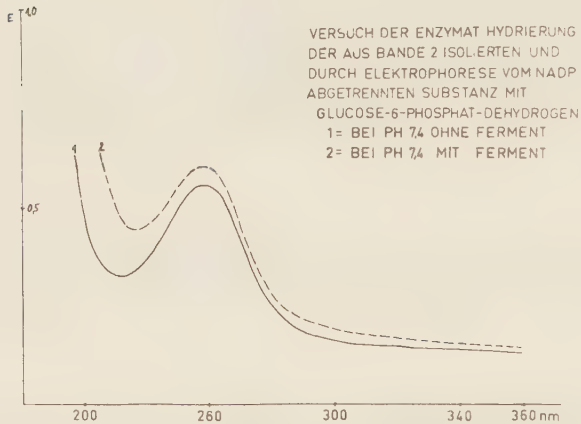


Abb. 43 a

Versuch der enzymatischen Hydrierung der aus Bande 2 isolierten und vom NADP abgetrennten Substanz des enzymatischen Austauschversuchs mit NADP und 6-Amino-Pyridin-3-Carboximid als Antimetabolit

Lösung: 0,03 µMol/ml in Phosphatpuffer pH 7,4 , 1,8 mg SCl_2 ,
Glucose-6-Phosphat 1,6 mg, Gesamtvolumen: 3,0 ml

1 ohne , 2 mit 0,01 ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
(Konzentrat, Boehringer)

Die nachfolgenden Ribose- und Phosphatbestimmungen ergaben bei der im enzymatischen Austauschversuch mit NADP und 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Anti-metabolit in Fraktion 2 vorhandenen, aus der im Elektropherogramm neu aufgetretenen, isolierten Substanz ein Verhältnis von Phosphat zu Ribose = 3,1 : 1,81 bei Zugrundelegung der theoretisch zu erwartenden Meßwerte. Die Messungen erfolgten nach dem Prinzip, daß zunächst von Vergleichslösungen von 5'-AMP und NADP (0,2 μ Mol/ml) der Phosphat- und Riboseanteil jeweils nach den in der Methodik beschriebenen Verfahren bestimmt wurde, und die erhaltenen Werte in Relation zueinander gesetzt wurden. Dabei ergab sich für 5'-AMP ein Verhältnis von Phosphat : Ribose = 1 : 1,02, während die Messungen bei NADP ein Verhältnis von Phosphat : Ribose = 2,98 : 1,6 lieferten. Daß bei der Ribosebestimmung, nicht wie zu erwarten war, statt 2 nur 1,6 molarer Anteile ermittelt wurden, scheint so erklärbar, daß bei Ribosebestimmungen am NADP die zweite Ribose nicht völlig mit dem Verfahren nach Meybaum erfaßt werden kann, jedoch relativ konstante Werte ergibt, wie Meybaum 1938 (39) festgestellt hat. Damit wäre auch erklärbar, daß das Verhältnis von Phosphat : Ribose bei der aus Fraktion 2 isolierten Substanz, bezogen auf AMP = 3,14 : 1,7 , jedoch bezogen auf NADP 3,19 : 2,2 (s. Tabelle IV).

Die Ausbeute an 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid-Analogem des NADPs pro Versuch bei 40 mg (32,2 μ Mole) eingesetztem NADP nach Reinigung und Isolierung durch Fällung betrug durchschnittlich 2,0 mg, was einem prozentualen Anteil von 5 % d.Th. bedeutet. Ein Schmelzpunkt der Substanz war nicht zu erhalten. Die Substanz zersetzte sich oberhalb 150°C unter Braunfärbung. Sie war frei von NADP, wie der Versuch der enzymatischen Hydrierung mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zeigt (Abb. 43 a S. 57 a) und zeigte elektrophoretisch ein einheitliches Verhalten.

Tabelle IV

Bestimmung des Phosphat-Ribose-Verhältnisses der aus
Fraktion 2 des Versuchs der enzymatischen Synthese
eines NADP-Analogen mit NADP und 6-Amino-Pyridin-
3-Carboximamid als Antimetabolit isolierten Substanz

Im 5'-AMP ist das Verhältnis Phosphat:Ribose = 1 : 1 ,
 in NADP ist das Verhältnis Phosphat : Ribose = 3 : 2 ,
 in NADP-Analogen muß das Verhältnis Phosphat:Ribose
 = 3 : 2 erhalten bleiben. Diese Beziehung war Grund-
 der folgenden Messungen:

Einwaage: 5'-AMP (MG 391,2) : 7,82mg/100ml H₂O = 0,2µM/ml
 NADP (MG 765,4) : 15,58mg/100ml H₂O = 0,2µM/ml
 Aus Fraktion 2 isolierte Substanz, NADP-
 Analoges des 6-Amino-Pyridin-3-Carboxim-
 amids (MG 774,4) : 1,55mg/10ml H₂O = 0,2µM/ml

Mit jeweils 0,5 bzw. 1,0ml dieser Lösungen wurden
 die Phosphat- und Ribosebestimmungen durchgeführt.

Für 5'-AMP ergaben die Messungen:

E ₆₆₀ % P/ml	E ₆₆₈ % Ribose/ml
510 : 6,15	500 : 34,0
490 : 5,90	450 : 30,5
520 : 6,25	465 : 31,5
530 : 6,35	485 : 32,0
530 : 6,35	465 : 31,5
6,20 ± 0,09 P/ml	31,9 ± 0,6 Ribose/ml

Für NADP ergaben die Messungen:

E ₆₆₀ % P/ml	E ₆₆₈ % Ribose/ml
780 : 19,2	680 : 47,0
730 : 18,0	670 : 46,5
720 : 17,7	705 : 48,0
755 : 18,6	730 : 50,0
710 : 17,5	710 : 48,5
18,2 ± 0,4 P/ml	48,0 ± 0,6 Ribose/ml

Für die aus Fraktion 2 isolierte Substanz ergaben die Messungen:

E_{800} 5' P	E_{668} Ribose/ml
810 20,0	820 56,0
770 19,0	770 52,5
760 18,7	760 52,0
830 20,5	810 55,5
785 19,3	810 55,5
$19,5 \pm 0,4$ P/ml	$54,3 \pm 0,9$ Ribose/ml

Rechnerisch sind enthalten in:

0,2 μ M 5'-AMP = 6,2 γ P und 30,0 γ Ribose

0,2 μ M NADP = 18,6 γ P und 60,0 γ Ribose

0,2 μ M NADP-Analogen = 18,6 γ P und 60,0 γ Ribose

Unter Zugrundelegung der theoretischen Werte ergibt sich für die erhaltenen Meßergebnisse ein Verhältnis Phosphat zu Ribose:

Bei 5'-AMP = 1 : 1,02

Bei NADP = 2,98 : 1,6

Bei der aus Fraktion 2 isolierten Substanz = 3,1 : 1,81,

bezogen auf die Meßwerte von 5'-AMP = 3,14 : 1,7 ,

bezogen auf die Meßwerte von NADP = 3,19 : 2,2.

Zur Ermittlung der Basenanteile wurden die Extinktionen der Lösungen 0,2 $\mu\text{Mol/ml}$ AMP, NADP und der aus Fraktion 2 isolierten Substanz bei 260 nm gemessen.

Nach Lambert-Beer gilt:

$$\text{Gehalt } [\mu\text{Mol/ml}] = \frac{E \cdot V}{v \cdot d \cdot \epsilon}, \text{ wobei}$$

V = Testvolumen in ml

v = Probevolumen in ml

d = Schichtdicke in cm

ϵ = mikromolarer Extinktionskoeffizient $[\text{cm}^2 / \mu\text{Mol}]$ ist.

Für AMP ergab sich

	v (ml)	E ₂₆₀	
V = 5,0 ml			
v = 1,0 ml			
d = 1 cm	1,0	1,020	
$\epsilon = 15,4$	1,0	1,030	
E = gem. Extinktion 260 nm	1,0	1,020	Mw = 1,025
	1,0	1,005	
	1,0	1,004	

$$\frac{1,023 \cdot 3}{1 \cdot 1 \cdot 15,4} = 0,199 \mu\text{Mol/ml AMP}$$

Für NADP ergab sich

	v (ml)	E ₂₆₀	
V = 5,0 ml			
v = 1,0 ml			
d = 1 cm	1,0	1,150	
$\epsilon = 18,0$	1,0	1,150	
	1,0	1,200	Mw = 1,180
	1,0	1,190	
	1,0	1,210	

$$\frac{1,18 \cdot 3}{1 \cdot 1 \cdot 18} = 0,197 \mu\text{Mol/ml NADP}$$

Für die aus Fraktion 2 isolierte Substanz ergab sich:

V = 5,0 ml	v (ml)	$\frac{A_{280}}{v}$	
v = 0,25-0,75 ml			
d = 1 cm	0,25	0,290	Mw = 0,230
ϵ = bei 10,0	0,25	0,285	
	0,5	0,590	Mw = 0,590
	0,5	0,605	
	0,75	0,900	

$$\frac{0,285 \cdot 5}{0,25 \cdot 1 \cdot 10} = 0,192 \text{ } \mu\text{Mol/ml}$$

$$\frac{0,590 \cdot 5}{0,5 \cdot 1 \cdot 10} = 0,199 \text{ } \mu\text{Mol/ml}$$

$$\frac{0,9 \cdot 5}{0,75 \cdot 1 \cdot 10} = 0,2 \text{ } \mu\text{Mol/ml}$$

Die Ergebnisse der Messungen zeigten, daß bei den eingesetzten Lösungen von 5'AMP, NADP und der aus Fraktion 2 isolierten Substanz die Basenanteile den eingesetzten 0,2 $\mu\text{Mol/ml}$ entsprechen.

Zur Ermittlung der spezifischen Extinktion der aus Fraktion 2 isolierten NADP-analogen Substanz wurden die Meßwerte s.o. in die Gleichung $\epsilon = \frac{E \cdot V}{v \cdot d \cdot \mu\text{Mol/ml}}$

eingesetzt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

$$17,4 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

$$17,1 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

$$17,7 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

$$18,15 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

$$18,0 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

Daraus ergab sich ein Mittelwert von $= 17,7 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ als mikromolarer Extinktionskoeffizient.

d) In vitro-Kontrollversuche über die Funktionsfähigkeit der mikrosomalen Glycohydrolase mit 6-Amino-Nikotinamid als Antimetabolit zum Vergleich für negativ verlaufene Austauschversuche

Paralell mit den unter A.4 a-c beschriebenen enzymatischen Austauschversuchen mit verschiedenen Antimetaboliten wurden Testversuche mit 6-Amino-Nikotinamid als Antimetabolit durchgeführt, um Kenntnis über die Funktionsfähigkeit der in der mikrosomalen Fraktion enthaltenen Glycohydrolase zu erhalten. Dazu wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

- 1) 40 mg NADP (52,2 μ Mole) gelöst in 10 ml m/15 Phosphatpuffer pH 6,6
- 2) 137 mg 6-Amino-Nikotinamid (1,0 mMol)
- 3) 1,0 ml Milzmikrosomensuspension
- 4) Inkubationszeit 2 h

Die Reaktion wurde durch Denaturieren des Enzymproteins durch rasches Erhitzen auf 96°C für 1 Minute im Wasserbad gestoppt. Das gefällte Eiweiß wurde durch Abzentrifugieren in der Laborzentrifuge (3 000 U/min, 10 min lang) abgetrennt. Der klare Überstand wurde durch anschließende Ionenaustauschchromatographie nach Methodik II C in seine Komponenten zerlegt (Abb.43 b).

Durch anschließende zweimalige Papierchromatographie in dem Flißmittelgemisch n-Propanol:Wasser:Ameisensäure (9:3:1) wurde das blau fluoreszierende 6-ANADP von NADP abgetrennt, die Papierareale ausgeschnitten und mit Aqua dest. absteigend eluiert und das so isolierte 6-ANADP spektrophotometrisch bestimmt, indem die Extinktion des Eluates bei 260 nm am DB-Photometer (Beckman) sowie das Volumen des Eluates gemessen wurden und dann durch Beziehen auf den mikromolaren Extinktionskoeffizienten von 6-ANADP (260 nm) (54) ermittelt wurde. (Tab. IV a, S. 59f)

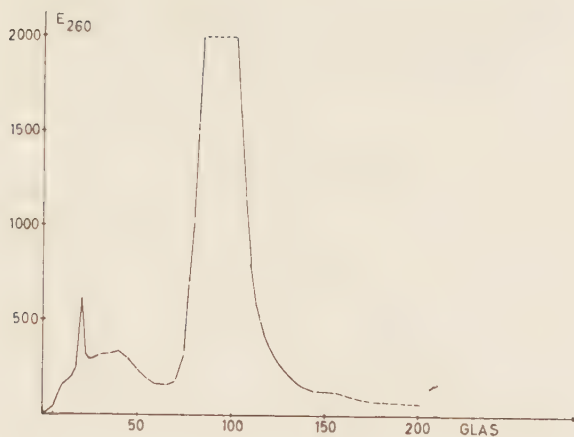


Abb. 43 b

Ionaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte
von NADP und 6-Amino-Nikotinamid als Antimetabolit
nach Einwirkung der Glycohydrolase aus Rattenmilzmikro-
somen in vitro.
Austauscher: Dowex 1x10, Formiatform, Elutionsmittel:
4 n CH_3COOH , Fraktionsvolumen: 5 ml/Glas

Tabelle IV a

Bildung von 6-ANADP nach zweistündiger Einwirkung der
Glycohydrolase aus Milzmikrosomen (Ratten) zur
Testung der Funktionsfähigkeit des Enzyms

$$\text{Behalt (} \mu\text{Mol)} = \frac{E \cdot V}{a \cdot \epsilon} \left[\frac{\text{cm}^3 \cdot \mu\text{Mol}}{\text{cm} \cdot \text{cm}^2} \right]$$

PC-Quat 260	ml	E · V	6-ANADP (21,5) μMol	vorgelegt: μMol NADP	Prozent
0,010	100	81000	3,8	52,2	7,3
0,720	50	36000	1,7	26,1	6,1
0,050	90	56700	2,6	26,1	10,0

Es ergab sich eine durchschnittliche Ausbeute an 6-ANADP in den Testversuchen von 8,0%. Dieser Wert liegt etwas unter der von Brunnemann und Coper 1954 (25) gefundenen 6-ANADP-Ausbeute nach einstündiger Einwirkung der Glycohydrolase aus Gehirnmikrosomen (Ratten) auf NADP und 6-AN. Diese parallel zu den negativ verlaufenen Austauschversuchen gemachten Testversuche mit 6-AN ließen den Schluß zu, daß die Funktionsfähigkeit der mikrosomalen Glycohydrolase erhalten war.

A.5. Versuch der enzymatischen Synthese falsch strukturierten Pyridinnucleotide in vivo mit 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob in vivo mit 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit ein abnormes Nucleotid gebildet werden kann.

Dazu bekamen männliche Ratten im Gewicht von 130 bis 150 g Lebendgewicht 100 mg/kg Körpergewicht 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid gelöst in einer Infusionslösung nach Methodik J 1 intraperitoneal injiziert. Nach 90 Minuten wurden die Tiere dekapiert und die Nieren nach II H aufgearbeitet. Der neutralisierte Extrakt wurde auf einer Ionenaustauschersäule Dowex 1x10 in seine Komponenten zerlegt, die Eluate gefriergetrocknet und anschließend durch Papierchromatographie weiter aufgetrennt (Abb. 44).

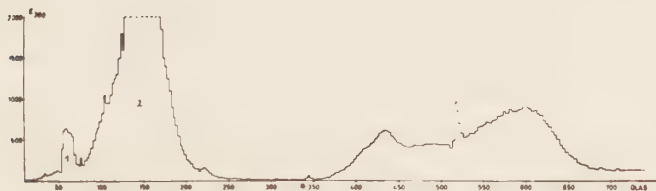


Abb. 44

Elutionsdiagramm: Versuch der enzymatischen Synthese des NADP-Analogen in vivo mit 6-AP-3-OA als Antimetabolit
Elutionsmittel: 0-200 Q, 1 n HCOOH, 201-350 2n HCOOH, 351-500 4n HCOOH, 500-Ende 4n HCOOH + 0,5n HCl

Nach eingehender Untersuchung der einzelnen Banden, insbesondere Bande 2, war kein falsch strukturiertes Pyridinnucleotid nachweisbar.

A.6. Glucuronidbestimmung im Harn von Ratten nach
Gabe von 100 mg/kg 6-Amino-Pyridin-3-Carboxim-
amid

Da nach Injektion von 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid in den Nieren der Versuchstiere kein abnormes Pyridin-nucleotid nachgewiesen werden konnte, wurde, um etwas über den Metabolismus dieses in 6-Stellung Amino-substituierten Pyridinkörpers aussagen zu können, Urin 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid-behandelter Tiere hinsichtlich des Glucuronidanteils gegenüber Kontrollharn unbehandelter Tiere untersucht. Dazu wurden männliche Ratten von ungefähr gleichem Gewicht in die Infusionsmaschine nach Methodik J 1 gesetzt und bekamen pro Stunde 5 ml einer isotonischen Lösung aus Glucose und NaCl. Alle Stunde wurde der Harn abgenommen, im Verhältnis 1:10 verdünnt und eine Glucuronsäurebestimmung nach Dische vorgenommen. Desgleichen wurde verdünnter Harn (1:100) gegen Blindharn bei 269 nm im Photometer gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 45 und 46 graphisch dargestellt. Es ergab sich, daß die Glucuronsäurewerte gegenüber den Kontrollwerten nur unwesentlich erhöht sind. Nach 5 Stunden post injectionem sind schon etwa 68,5 % des injizierten Antimetaboliten wieder ausgeschieden.

Anschließend wurden Harnproben vereinigt und am Rotawapor bei 20°C eingeengt, mit Chloroform gereinigt, mit warmem Aceton extrahiert und einer Papierchromatographie zugeführt. Beim Betrachten unter dem UV-Licht zeigte sich, daß weitaus die größte Menge des 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid unverändert über die Nieren ausgeschieden wurde (s. Abb. 47). Dieser Befund wurde durch ein Vergleichschromatogramm (s. Abb. 48) mit dem Harn der Kontrolltiere ergänzt.

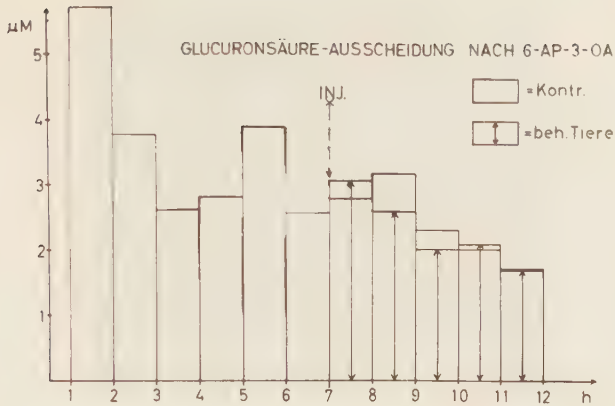
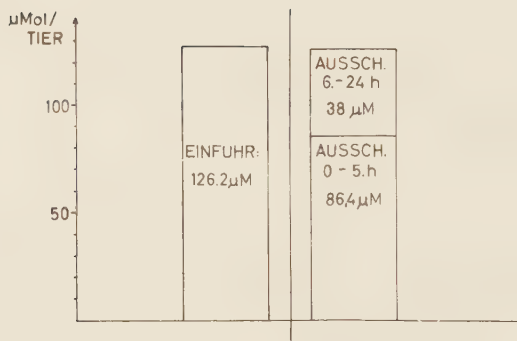


Abb. 45

Glucuronsäureausscheidung pro Stunde im Harn von Ratten nach intravenöser Applikation von 100 mg/kg von 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid unter Dauerinfusion einer Lösung 43, % Glucose plus 0,2% NaCl / 5ml/h, INJ: Zeitpunkt der Injektion zu Beginn der siebenten Stunde 100mg/kg 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid gelöst in Infusionslösung, die Kontrolltiere erhielten zum gleichen Zeitpunkt eine äquivalente Menge reiner Infusionslösung



EINFUHR-AUSSCHIEDUNGS - BILANZ VON 6-AP-OA

Abb. 46

Einfuhr- - Ausscheidungsbilanz in $\mu\text{Mol}/\text{Tier}$ im Rattenharn nach Gabe von $126,2 \mu\text{Mol}$ 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid/Tier, Ausscheidung unveränderter Substanz bis zur fünften Stunde post injectionem: $86,4 \mu\text{Mol}$, Ausscheidung unveränderter Substanz 6-24. Stunde: $38,0 \mu\text{Mol}$.
 Insgesamt: $124,4 \mu\text{Mol}$



Abb. 47

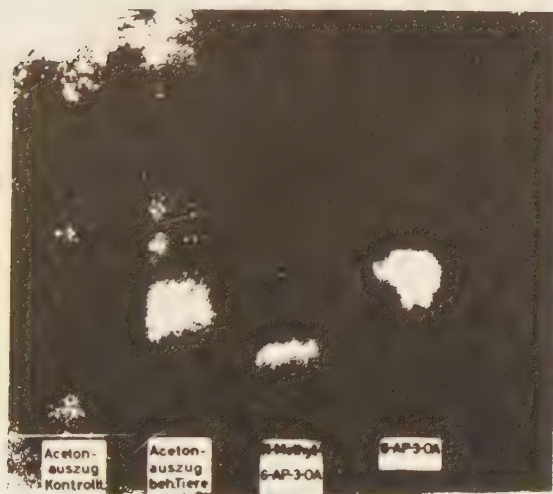


Abb. 48

Papierchromatographische Untersuchung des mit Aceton extrahierten Rattenharns nach Gabe von 100mg/kg 6-Amino-Pyridin-3-Carboximid und vergleichsweise mit Aceton extrahierten Harn unbehandelter Ratten
Vergleichssubstanzen: 6-Amino-Pyridin-3-Carboximid, N-Methyl-6-Amino-Pyridin-3-Carboximid-Jodid
Lösungsmittel: n-Butanol, Äthanol, Ammoniak, Wasser/11:1:2:1
Papierchromatogramme zeigen Ausscheidung unveränderter Substanz

B.1. Enzymatischer Austausch von 6-Aminonikotinamid
gegen Nikotinamid des NADs und NADPs in vivo in
der Rattenniere in der Proliferationsphase nach
Gaben von 500 mg/kg Folsäure iv.

Ziel dieser Versuche sollte sein, festzustellen, ob die Nucleosidase (Glycohydrolase) in ihrer Fähigkeit Nikotinamid gegen andere Antimetabolite (hier 6-Aminonikotinamid) auszutauschen, durch Folsäuregaben (500 mg/kg) beeinflusst wird.

Dazu bekamen männliche Ratten von 140-150 g Gewicht 500 mg/kg Natriumfoliat in wässriger Lösung unter Aethernarkose in die Schwanzvene injiziert. Nach 96 Stunden wurden 50 mg/kg 6-Aminonikotinamid intraperitoneal verabfolgt. Nach weiteren 6 Stunden, als die Tiere schon deutliche Lähmungserscheinungen zeigten, wurden sie dekapitiert, die Nieren gewogen, in flüssiger Luft sofort eingefroren und nach H.1 aufgearbeitet. Der so erhaltene neutrale Extrakt wurde auf Ionenaustauschersäulen nach Ç. in seine Komponenten zerlegt. Danach folgte Gefriertrocknung der Banden nach D. mit anschließender Papierchromatographie nach E. Die genau bezeichneten Streifen der Papierchromatogramme wurden mit Aqua dest. eluiert und danach definierte Mengen des Eluates der spektrofotometrischen Bestimmung der 6-AN- und der natürlichen Nucleotide nach I. zugeführt.

Der 6-ANAD-Gehalt der Nierenextrakte Folsäure-vor-behandelter Tiere war bezogen auf die Summe NAD+ 6-ANAD gegenüber den Nierenextrakten von Tieren, die nur 6-AN erhalten hatten, um 22,9% erhöht, der 6-ANADP-Gehalt bezogen auf die Summe NADP+6-ANADP um 9,3% erhöht.

Der 6-AN-Einbau in NAD betrug bei alleiniger Gabe von 6-AN durchschnittlich 40,7% (bezogen auf die Summe NAD+6-ANAD), der 6-AN-Einbau in NADP 44,0% (bezogen auf die Summe NADP+6-NADP).

Nach Folsäurevorbehandlung stieg der 6-ANAD-Gehalt der Nierenextrakte auf durchschnittlich 63,6, % an, der 6-ANADP-Gehalt stieg auf 53,3 % an.

Der 5'-AMP-Gehalt der Nierenextrakte sank gegenüber dem Gehalt an 5'-AMP der Nierenextrakte der Tiere, die ausschließlich 6-AN erhalten hatten, nach Folsäurevorbehandlung um 37,7 % ab. Diese Befunde sind in Tabelle V zusammengefaßt.

Die Abweichung der in diesen Bestimmungen ermittelten Gehalte an natürlichen und 6-AN-haltigen Pyridinnucleotiden von denen, die in der Literatur angegeben sind, ist möglicherweise auf die hier benutzte aufwendigere Aufarbeitungsmethode zurückzuführen. Da die ermittelten Werte durchweg unter denen in der Literatur angegebenen liegen, ist die Ursache dafür darin zu suchen, daß in perchlorsauren Extrakten die NAD(P)-ase ihre Aktivität nicht vollständig verloren hat (Lowry 1961 (40)). Herken und Neuhoﬀ haben bei verschiedenen Extraktions- und Aufarbeitungsmethoden zur Bestimmung von Pyridinnucleotiden in Rattennieren erhebliche Unterschiede der Werte gefunden (42). Es können die Ergebnisse (insbesondere für NADP und 6-ANADP) nur als Relativwerte gesehen werden.

6-AN-Einbau in vivo in der Rattenniere 96 h nach
Gabe von 500 mg/kg Folsäure und 50 mg/kg 6-AN,
90 h nach Folsäureverabreichung

Tabelle V

Spalte I gibt 6-ANAD-, NAD-, 6-ANADP-, NADP- und 5'-AMP-Konzentrationen in $\mu\text{Mol/g}$ Feuchtgewicht an, 6 h nach i.p. Injektion von 50 mg/kg 6-AN
 Spalte II gibt 6-ANAD-, NAD-, 6-ANADP-, NADP- und 5'-AMP-Konzentrationen in $\mu\text{Mol/g}$ Feuchtgewicht an, 500mg/kg Folsäure iv., 90 h später 50 mg/kg 6-AN, 96 h nach Folsäuregabe Dekapitation

	I	II
6-ANAD-Gehalt	0,123 $\pm$ 0,012	0,173 $\pm$ 0,009
NAD-Gehalt	0,182 $\pm$ 0,020	0,099 $\pm$ 0,008
6-ANADP-Gehalt	0,0295 $\pm$ 0,006	0,038 $\pm$ 0,008
NADP-Gehalt	0,0375 $\pm$ 0,007	0,034 $\pm$ 0,006
5'-AMP	1,22 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,05

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen.

7.

2. ATP-Messung in der Rattenniere nach Gabe von
500 mg/kg Folsäure und 50 mg/kg 6-Amino-Nikotinsäure-
amid

Um über die Energieverhältnisse der durch Folsäurebehandlung geschädigten Niere eine Aussage machen zu können, wurde der ATP-Gehalt 96 h post injectionem von 500 mg/kg Folsäure, bzw. 96 h post injectionem von 500 mg/kg Folsäure und 6 h post injectionem von 50 mg 6-Amino-Nikotinamid von Rattennieren bestimmt. Dazu wurden männliche Ratten im Gewicht von 140-150 g wie unter B.1. S. 64 beschrieben mit Folsäure und 90 h nach der Folsäuregabe mit 6-AN behandelt. Nach 6 weiteren Stunden wurden die Tiere dekapiert und die Nieren nach Methodik H.1. aufgearbeitet. Der neutrale Extrakt wurde der enzymatischen ATP-Bestimmung zugeführt. Dabei ergab sich, daß bei Tieren, die ausschließlich Folsäure erhalten hatten, der ATP-Gehalt pro Niere von 1,38 μMol bei unbehandelten Tieren auf 1,01 μMol ATP/ Niere abgesunken war. Der ATP-Gehalt von Nieren nur mit 6-AN behandelter Tiere betrug 0,95 μMol ATP/Niere. Nieren von Ratten, die Folsäure und zusätzlich 6-AN bekommen hatten, enthielten 1,1 μMol ATP/ Niere. (Die Angabe : Gehalt ATP/Niere wurde gewählt, weil die Vergrößerung der Nieren nach Folsäuregabe die Ergebnisse so verändern würde, daß bei Angabe : Gehalt ATP/g Feuchtgewicht Niere bei Versuchen, bei denen die Tiere mit Folsäure vorbehandelt wurden, die Feuchtgewichtsvermehrung in die Berechnung eingehen würde.) Die Befunde sind in Abb. 49 graphisch dargestellt.

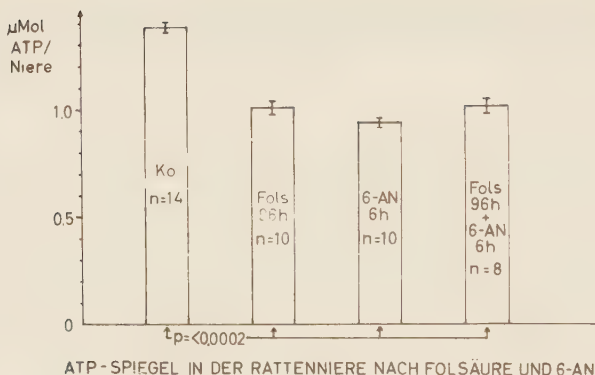


Abb. 49

ATP-Gehalt von Rattennieren nach 500 mg/kg Folsäure 96 h post injectionem, nach 6-Amino-Nikotinamid 50 mg/kg 6 h post injectionem, sowie nach Folsäure 500 mg/kg, 96 h post injectionem und 6-Amino-Nikotinamid 50 mg/kg 6 h post injectionem enzymatisch bestimmt

Ko= Kontrolltiere ohne Vorbehandlung

Fols. 96 h = 500mg/kg Folsäure 96 Stunden post injectionem

6-AN 6h = 50mg/kg 6-Amino-Nicotinsäureamid 6 Std.post inj.*)

6-AN +Fols. = 500 mg/kg Folsäure 96 Std. post inj. und 50mg/kg

6 Std. post inj.

*) Neuere Untersuchungen in unserem Institut ergaben, daß der ATP-Gehalt der Nieren nach Gabe von 6-AN nicht unter den Wert der unbehandelten Tiere absinkt. Der Nachweis gelingt aber nur bei Anwendung des Gefrierstops bei der Präparation der Nieren. Bei unseren Messungen wurde der Gefrierstop nicht angewendet, so daß die niedrigen ATP-Werte der 6-AN-behandelten Tiere durch enzymatische Abbauprozesse während unserer Präparation der Nieren erklärbar ist.

Um darüber hinaus noch Einsicht in die zeitliche Verschiebung der Energieverhältnisse während der nach Schädigung durch Folsäure folgenden Regenerationsphase zu erhalten, wurde in variierenden Abständen nach Folsäuregabe 500mg/kg die enzymatische ATP-Messung durchgeführt, und zwar nach 15, 30, 45, 60, 120 min, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h. Die erhaltenen Werte wurden in ein Koordinatensystem eingetragen, wobei sich eine Kurve ergab, die Abb. 53 wiedergibt.

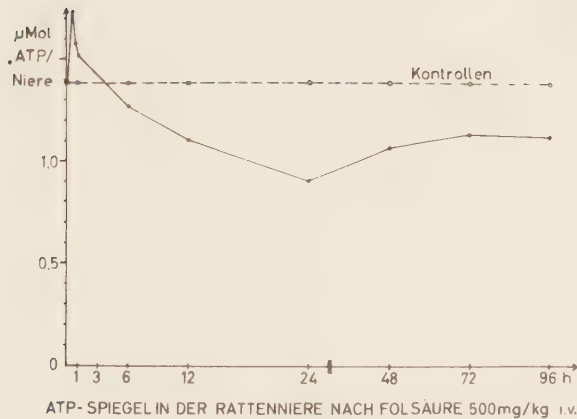


Abb. 50

Aus der graphischen Darstellung geht hervor, daß nach einem sehr kurzen Anstieg der ATP-Spiegel in der geschädigten Niere fast kontinuierlich absinkt und nach 24 Stunden seinen tiefsten Wert erreicht. Danach folgt ein allmählicher Wiederanstieg, der sich über einen längeren Zeitraum erstreckt und 96 h post injectionem von Folsäure die Werte der Kontrolltiere noch nicht wieder erreicht.

IV. DISKUSSION

Wie einleitend gesagt, ist es möglich, in vitro und auch in vivo abnorm strukturierte Pyridinnucleotide zu bilden. Die geringe Spezifität der NAD(P)-Glycohydrolase gibt uns die Möglichkeit, diese enzymatischen Synthesen durch Variation des Angebots an Nikotinamid-Analogen zu beeinflussen.

Die Reaktion hängt wie bei jedem enzymatischen Prozeß von vielen Faktoren ab:

1. Löslichkeit des Antimetaboliten

Zunächst beeinflußt das durch Hydrolyse des NAD(P)s entstandene Nikotinsäureamid das System, da es mit dem zugesetzten Antimetaboliten um den Enzymkomplex konkurriert (50, 24). Normalerweise wird der Antimetabolit eine wesentlich geringere Affinität zum Enzymkomplex als das Nikotinsäureamid besitzen, daher muß er in wesentlich höherer Konzentration dem System angeboten werden, um in die Resynthese des Nucleotids mit einbezogen zu werden. Erst wenn die Konzentration mehr als das 100-fache des Nikotinsäureamids beträgt, kann man das Gleichgewicht fast vollständig in Richtung des falschen Nucleotids verschieben. Daraus folgt, daß in Versuchen die Synthese abnormer Pyridinnucleotide durch die Löslichkeit des Antimetaboliten limitiert wird. Das gilt z.B. für das untersuchte 2,4-Diamino-6-Phenylpteridin. Die Löslichkeit von Aminopteridinen nimmt in wässrigem Medium mit steigender Anzahl an Aminogruppen rapide ab, so daß Aminopteridine mit drei Amino-Substituenten praktisch unlöslich sind (51). Deshalb wurde anstelle des Triamterens

(2,4,7-Triamino-6-Phenylpteridin) das etwas besser lösliche 2,4-Diamino-6-Phenylpteridin für die Versuche verwendet. Die Unmöglichkeit, mit dieser Substanz ein Pyridinnucleotid zu synthetisieren, läßt vermuten, daß die Konzentration des Antimetaboliten offenbar die Konzentration des abhydrolysierten Nikotinamids weder erreichte noch überschritt, was für eine effektive Competition die Voraussetzung wäre. Auch der Zusatz von bekannten Lösungsvermittlern (Polyäthylenglykol, Tween 80 und Monomethylacetamid) konnte die Löslichkeit der eingesetzten Pteridine nicht verbessern.

2. Quarternierbarkeit des reaktiven Stickstoffs im Ringsystem

Es sprechen noch andere Faktoren gegen einen Austausch von Pteridinen gegen Nikotinsäureamid: Während sich Pyridin sehr leicht mit Methyljodid zu N-Methyl-Pyridiniumjodid umsetzen läßt, ist dieses Beispielsweise bei Acridin infolge sterischer Hinderung nur sehr schwer zu erreichen (52). Es ist denkbar, daß bei Pteridinen, die zu ähnlichen kondensierten Ringsystemen zählen, eine analoge Beobachtung zu machen ist.

3. Die Basizität des reaktiven heterozyclischen Stickstoffs

Die Basizität des reaktiven Stickstoffs im Ring ist von ausschlaggebender Bedeutung für eine enzymatische Transferierung auf NAD(P). So läßt sich zum Beispiel Isonikotinsäure ($PK_s = 1,84$) im Gegensatz zu Isonikotinsäureamid ($PK_s = 3,82$) nicht auf das NAD(P) übertragen (53). Der PK_s -Wert des Isonikotinsäureamids ist deutlich größer als der der Isonikotinsäure. 2,4-Diaminopteridin besitzt als Bezugssubstanz einen PK_s -Wert von 0,5 bzw. 5,32 (66), unterscheidet sich damit deutlich vom PK_s -Wert des Isonikotinsäureamids. Hierin wäre ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer Nucleotidsynthese mit Pteridinen als Antimetabolite zu sehen.

Die Ursache für den negativen Ausgang der in vitro-Versuche mit den Antimetaboliten vom Typ der 1,3-Dimethyl-2,4-Dioxo-6-Phenyl-7-Chlor, bzw. 7-Hydroxy-Pteridine scheint trotz der ungleich besseren Löslichkeit darin zu liegen, daß der Elektronen-anziehende Effekt der Oxygruppen wie auch der Hydroxygruppe bzw. des Chlors in Stellung 7 die Basizität des reaktiven Ringstickstoffs soweit herabsetzte, so daß eine enzymatische Transferierung auf das NAD(P) ausgeschlossen war.

Bei den untersuchten Pyridinderivaten, die ausreichend löslich, gut quarternierbar und von ausreichender Basizität sind, kommt als neuer limitierender Faktor hinzu:

4. Die Reaktivität des Ringstickstoffs unter Beeinflußung durch benachbarte Substituenten

So z.B. gehört bei Pyridinderivaten die Aminogruppe in Stellung 6 zu den Substituenten 2. Ordnung mit Elektronen-abstoßendem Effekt. Der Ringstickstoff wird also in bezug auf seine Basizität begünstigt. Halogenatome andererseits wie Fluor oder Chlor, die als Substituenten 1. Ordnung elektronenanziehenden Charakter besitzen, setzen die Basizität des heterozyklischen Stickstoffs herab. Das gilt beispielsweise für das 2-Fluor-Pyridin ($PK_s = 0,4$) und das 6-Chlor-3-Acetylpyridin, mit denen eine Nucleotidbildung nicht gelang, während mit 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid die Nucleotidsynthese möglich war, zumal die N-Methylierung als Kriterium für die Quarternierbarkeit leicht gelang.

Auch die Substituenten in Stellung 3 des PyridinGrundgerüsts nehmen Einfluß auf die Reaktivität des Ringstickstoffs: So läßt sich ein abnorm strukturiertes Pyridinnucleotid mit 6-Amino-Nikotinamid als Antimetabolit enzymatisch synthetisieren (54,25). Jedoch gelingt es nicht, ein Pyridinnucleotid zu bilden, das im Austausch gegen Nikotinsäureamid das 6-Amino-

Pyridin-3-Sulfonamid besitzt, obwohl auch bei dieser Substanz die N-Methylierung ohne Schwierigkeiten durchführbar war. Der saure, das heißt, elektronenanziehende Charakter der $\text{SO}_2\text{-NH}_2$ -Gruppe wirkt sich offenbar auch noch in Stellung 3 auf den Ringstickstoff aus und erniedrigt die Basizität derart, daß kein Austausch möglich ist. Vergleichende Untersuchungen mit 4-, 3- und 2-Acetylpyridin (12) ergaben, daß mit 2-Acetylpyridin keine Transferierung auf NAD(P) möglich ist, während mit 3- und 4-Acetylpyridin die Darstellung der NAD(P)-Analoge mit guter Ausbeute gelang. Diese korreliert mit den Befunden von A. Albert (55), nach denen bei Pyridinen der Einfluß der elektrophilen Substituenten von Stellung 4 über 3 bzw. 5 nach Stellung 2 bzw. 6 zunimmt.

Für die in vivo-Versuche gilt prinzipiell das über die in vivo-Untersuchungen Gesagte. Allerdings lassen sich natürlich in bezug auf die Löslichkeit der Antimetabolite im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten keine genauen Aussagen machen. Untersuchungen mit Triamteren haben gezeigt, daß diese in Wasser praktisch unlösliche Substanz, oral verabfolgt, im Harn der Versuchspersonen teils metabolisiert teils unverändert wieder ausgeschieden wird (56). Die Hauptmetaboliten des Triamterens sind nach Lehmann die Schwefelsäure- und Glucuronsäureester des p-Hydroxy-Derivates. Es wäre denkbar, daß das untersuchte 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin, das nur eine Aminogruppe weniger besitzt als das Triamteren selbst, in ähnlicher Weise metabolisiert wird, ohne daß für die Bildung eines abnormen Nucleotids die erforderliche Konzentration erreicht wird. Das schließt die Existenz einer geringen Menge eines intermediär auftretenden instabilen, abnormen Nucleotids nicht völlig aus, da mit den benutzten Methoden eine Isolierung eines derartigen Metaboliten unmöglich wäre.

Die Metabolisierung des 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamids konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Substanz wird fast quantitativ unverändert im Urin ausgeschieden, wobei die Glucuronidausscheidung unbeeinflusst blieb und sich papierchromatographisch kein Anhalt für die Ausscheidung von Metaboliten ergab. Dieser Befund würde sich in die Reihe der Untersuchungen einpassen, die zwar nicht in vivo, wohl aber in vitro eine Transferierung eines Antimetaboliten auf NAD(P) zum Ergebnis hatten. Das trifft zu beim INH(25), 4-Acetylpyridin (12) und 5- bzw. 8-Amino-Chinolin (57). Das unterschiedliche Ergebnis der in vitro- und der in vivo-Versuche mit 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid als Antimetabolit könnte in Anlehnung an die Annahmen von Brünemann, Coper und Herken (1962) unter anderem dadurch bedingt sein, daß diese Substanz ähnlich wie 4-Acetylpyridin die Zellmembran oder die Bluthirnschranke nicht zu durchdringen vermag (12).

Die Untersuchung der Beziehung zwischen dem Substrat Triamteren und dem Enzym Glycohydrolase war nicht nur hinsichtlich einer abnormen Nucleotidbildung interessant sondern, da bekannt ist, daß Pteridine, z.B. Xanthopterin und Folsäure beträchtliche Nierenvergrößerungen erzeugen können (58, 59, 61, 62, 63), ergab sich die Frage, in welcher Weise Pteridine die Glycohydrolaseaktivität beeinflussen können. Als Maß für die Glycohydrolaseaktivität wurde die 6-AN-Nucleotidbildung benutzt. Diese war am 4. Tag nach Verabreichung von 500 mg/kg Körpergewicht Folsäure für das 6-ANADP um 9 % und für das 6-ANAD um 23 % erhöht, während der 6-AN-Einbau nach Verabreichung von 120 mg/kg Triamteren nahezu unbeeinflusst blieb. Dagegen sind Aktivitätssteigerungen der Folsäurereductase nach Triamteren und p-Hydroxy-Triamteren beschrieben (60) worden. Offenbar sind bestimmte Enzyme nach Verabreichung von bestimmtem Pteridinen aktivierbar,

wie die Untersuchungen von Herken, Voß, Brade und Kolbe (64) ergaben, andere Enzyme dagegen zeigen nach Folsäuregabe ein Aktivitätsabfall (Schmidt, Dubach, Thorhorst (67)). So kommt es nach 1,13 mMol Folsäure zu einer durch Actinomycin D und Cycloheximid hemmbaren Induktion der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, während nach den Untersuchungen von Schmidt, Dubach und Thorhorst 63 Stunden nach Verabreichung von 250 mg/kg Folsäure Hemmungen der Na^+ - und K^+ -ATPase und einiger anderer Dehydrogenasen wie iC-DH, M-DH und Lactat-DH beobachtet werden können.

Die nach Folsäuregabe auftretende Aktivitätssteigerung bzw. Induktion der beiden ersten Fermente des Pentosephosphatcyclus scheint erhebliche Bedeutung für die Folsäure-bedingte Stimulierung der RNS-Synthese zu haben: In den Untersuchungen von Herken, Voß, Brade und Kolbe (64) wird der Glucoseumsatz in Ribose, der nach Folsäuregabe erheblich vermehrt ist, durch 6-AN-Behandlung wieder annähernd auf den Kontrollwert reduziert. Hier scheint das 6-ANADP als Hemmstoff dieser NADP-abhängigen Enzyme zu wirken.

Die Abnahme des 5'-AMP in der Niere nach Folsäuregabe ist mit einer 96 Stunden post injectionem vorhandenen Senkung des ATP-Spiegels verbunden. Ähnliche Beobachtungen machte Gerlach et al. an der ischämischen Rattenniere 1963 (65).

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Nucleosidase (Glycohydrolase E.C.3.2.2.6.) aus Rattenmilz, -leber, -gehirn und Schweinehirn wurde auf ihre Fähigkeit hin, Pteridine vom Typ des Triamterens und Pyridinderivate gegen das Nikotinamid der natürlichen Pyridinnucleotide enzymatisch auszutauschen, untersucht.

2. Um die Voraussetzungen für eine biochemische Reaktion im Nucleosidasesystem beurteilen zu können, wurden die ausgewählten Pteridin- und Pyridinderivate auf deren Löslichkeit in wässrigem Medium sowie ihre Quarternierbarkeit durch N-Methylierung geprüft.

3. Die Nucleosidase (Glycohydrolase E.C.3.2.2.6.) kann unter den gewählten Bedingungen 6-Amino-Nikotinamid in vitro und in vivo gegen das Nikotinamid im NADP enzymatisch austauschen (Versuch zur Testung der Nucleosidase).

4. Es ist nicht gelungen, in vitro oder in vivo durch enzymatische Austauschreaktion mit Hilfe der Nucleosidase (Glycohydrolase E.C.3.2.2.6.) ein abnorm strukturiertes Pyridinnucleotid zu synthetisieren, bei dem das Nikotinamid durch 2,4-Diamino-6-Phenyl-Pteridin ersetzt worden ist.

Ferner ist es nicht gelungen, durch enzymatische Austauschreaktion mit Hilfe der Nucleosidase (Glycohydrolase E.C.3.2.2.6.) in vitro ein abnorm strukturiertes Pyridinnucleotid mit 6-Chlor-3-Acetylpyridin oder 6-Amino-Pyridin-3-Sulfonamid als Antimetabolit enzymatisch zu synthetisieren.

5. Ein abnorm strukturiertes Pyridinnucleotid konnte durch enzymatische Austauschreaktion in vitro mit Hilfe der Nucleosidase (Glycohydrolase E.C.3.2.2.6.) synthetisiert, isoliert und identifiziert werden. Es handelt sich dabei um ein NADP-Analoges, bei dem das Nikotinamid durch 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid ersetzt ist. In vivo konnte dieses Nucleotid nicht gefunden werden.

6. Die Untersuchungen zum Abbau von 6-Amino-Pyridin-3-Carboximamid ergaben, daß die Substanz im Zeitraum von 5 Stunden post injectionem zu 68,5% im Harn unverändert ausgeschieden wurde. Die Glucuronidausscheidung im gleichen Zeitraum war nicht erhöht.

7. Es wurde die enzymatische Synthese in vivo von 6-AN-haltigen Pyridinnucleotiden in der Regenerationsphase der Niere nach Gaben von 500 mg/kg Folsäure studiert. Dabei ergab sich, daß der Einbau von 6-Amino-Nikotinamid in NAD nach Folsäure um 23% und in NADP um 9% erhöht ist.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Zatman, L.J., N.O. Kaplan, S.P. Colowick : Inhibition of spleen diphosphopyridine nucleosidase by nicotinamide; an exchange reaction.
J.Biol. Chem. 200, 197 (1953)
2. Zatman, L.J., N.O. Kaplan, S.P. Colowick, M.M. Ciotti: The isolation and properties of the isonicotinic acid hydrazide analogue of diphosphopyridine nucleotide.
J. Biol. Chem. 209, 467 (1954)
3. Kaplan N.O., M.M. Ciotti: The 3-Acetylpyridine analogue of DPN.
J. Amer. Chem. Soc. 76, 1713 (1954)
4. Kaplan, N.O., M.M. Ciotti: Chemistry and properties of the 3-Acetylpyridine analogue of diphosphopyridine nucleotide.
J.Biol. Chem. 221, 823 (1956)
5. Alivisatos, S.G.A., D.W. Woolley: Synthesis of 5-amino-4-carboximidamidoimidazole-AD.
J. Amer. Chem. Soc. 77, 1065 (1955)
6. Alivisatos, S.G.A., F. Ungar, L. Lukacs, L. La Mantia: Imidazolytic processes.
J. Biol. Chem. 235, 1742 (1960)
7. Alivisatos, S.G.A.: Nature, 181, 271 (1958)
8. Alivisatos, S.G.A.: Mechanism of action of diphosphopyridine nucleotidases,
Nature, 183, 1034 (1959)
9. Anderson, B.M., N.O. Kaplan: Enzymatic studies with analogues of diphosphopyridine nucleotide.
J. Biol. Chem. 234, 1226 (1959)
10. Coper, H. , D. Neubert: Reaktionsgeschwindigkeit NAD(P)-abhängiger Oxydoreduktasen aus Rattengehirn mit 3-APAD.
J. Neurochem. 10, 513 (1963)

11. Coper, H., H. Herken: Pharmakologische Analyse der 3-Acetylpyridin-Vergiftung.
Arch. exp. Path. Pharmac. 247, 291 (1962)
12. Brunnemann, A., H. Coper, H. Herken: Isolierung von 5-Acetylpyridin-adenindinucleotid (5-APAD) aus dem Gehirn 3-Acetylpyridin-vergifteter Ratten.
Arch. exp. Path. Pharmac. 244, 223 (1962)
13. Brunnemann, A., H. Coper, H. Herken: Biosynthese von 3-Acetylpyridin-adenindinucleotidphosphat (3-APADP) aus Nikotinamid-adenindinucleotidphosphat.
Arch. exp. Path. Pharmac. 245, 541 (1963)
14. Johnson, W.J., J.D. McColl: 6-Aminonicotinamide, a potent nicotinamide Antagonist.
Science 122, 834 (1955)
15. Coper, H., H. Herken: Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten des Nicotinamids.
Dtsch. med. Wschr. 88, 2025 (1963)
16. Herken, H., G. Senft, B. Zemisch: Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kalium- Transportes durch Biosynthese 6-Aminonicotinsäureamid-enthaltender Nucleotide.
Arch. exp. Path. Pharmac. 249, 54 (1964)
17. Dietrich, L. S., I.M. Friedland, L. A. Kaplan: Pyridine nucleotide metabolism: Mechanism of action of the niacin antagonist 6-aminonicotinamide.
J. biol. Chem. 233, 964 (1958)
18. Warburg, O., W. Christian: Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten.
Biochem. Z. 287, 291 (1936)
19. Pullmann, M. E., A. San Pietro, S. P. Colowick: On the structure of reduced DPN.
J. Biol. Chem. 206, 129 (1954)
20. Walter, P., N. O. Kaplan: Substituted Nicotinamid Analogues of Nicotinamide Adenin Dinucleotide.
J. Biol. Chem. 238, 2823 (1963)

21. Dickermann, H. W., A. San Pietro, N. O. Kaplan: Pigspleen-pyridine transglykosidase.
Biochem. Biophys. Acta. 62, 30 (1962)
22. Kaplan, N.O.: The neurochemistry of nucleotides and aminoacids.
Brady and tower. Seite 75 (1959)
23. Powell, R. D.: The chemotherapy of malaria.
Clin. Pharmacol. Therap. Z. 48 (1966)
- 24.. Brunnemann, A., H. Coper: Hydrolyse von NAD(P) und Biosynthese von 3-APAD(P) durch Hirnmikrosomen verschiedener Tierarten.
Arch. exp. Path. Pharmak. 250, 469-478 (1965)
25. Brunnemann, A., H. Coper: Vergleichende Untersuchungen über die Biosynthese der NAD(P)- Analogen des 3-Acetylpyridins, 4-Acetylpyridins, 6-Aminonikotinamids und Isonikotinsäurehydrazids.
Arch. exp. Path. Pharmak. 248, 514 (1964)
26. Herken, H., G. Senft, B. Zemisch: Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes durch Biosynthese 6-Aminonicotinsäureamid enthaltender Nucleotide.
Arch. exp. Path. Pharmak. 249, 66 (1964)
- 27.. Coper, H., I. Helge, H. Herken: Über die Wirkung des Hexachlorcyclohexans auf die DPN- und TPN-Nucleosidase des Gehirns.
Arch. exp. Path. Pharmak. 243, 99-112 (1962)
28. Cohn, W. E.: The anion exchange separation of ribonucleotides.
J. Amer. Chem. Soc. 72, 1471 (1950)
- 29.. Cohn, W. E., C. E. Carter: The separation of adenosine polyphosphates by ion exchange and paper-chromatography.
J. Amer. Chem. Soc. 72, 4273 (1950)

30. Hurlbert, R. B., H. Schmitz, A. F. Brumm, V. R. Potter: Nucleotide metabolism Chromatographic-separation of acid-soluble nucleotides. J. Biol. Chem. 209, 23 (1954)
31. Koransky, W.: Trennung und Bestimmung der Nucleotide des Gehirns. Arch. exp. Path. Pharmac. 234, 46 (1958)
32. Markham, R., J.D. Smith: Chromatographic studies of nucleic acids. Biochem. J. 45, 294 (1949)
33. Brunnemann, A., H. Coper: Aktivität NAD- und NADP- abhängiger Enzyme. Arch. exp. Path. Pharmac. 245, 495 (1964)
34. Colowick, S. P., N. O. Kaplan, M. M. Ciotti: The reaction of pyridine nucleotide with cyanide and its analytical use. J. Biol. Chem. 191, 448-459 (1951)
35. Kaplan, N. O., S. P. Colowick, C. C. Barnes: Effect of Alkali of Diphosphopyridine-Nucleotide. J. Biol. Chem. 191, 461-472 (1951)
36. Berenblum, A., E. Chain: An improved method for the colorimetric determination of phosphate. Biochem. J. 32, 295 (1958)
37. Fiske, H., Y. Subbarow: The coloric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400 (1925)
38. Bartlett, G.R.: Phosphorus Assay in Column Chromatographie. J. Biol. Chem. 234, 466-468 (1959)
39. Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. Z. physiol. Chem. 258, 117 (1939)

40. Lowry, O. H., J. V. Passoneau, M. K. Rock: The stability of pyridine nucleotides.
J. biol. Chem. 236, 2756 (1961)
41. Lowry, O. H., N. R. Roberts, J. I. Kapphan: The fluometric measurement of pyridine nucleotides.
J. biol. Chem. 224, 1047 (1957)
42. Herken, H., Neuhoff, V.: Spektrofluometrische Bestimmung des Einbaues von 6-Aminonicotinsäureamid in die oxydierten Pyridinnucleotide der Niere.
Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 187-201 (1964)
- 43.. Dische, Z.: A new specific color Reaktion of Hexuronic Acids.
J. Biol. Chem. 167, 189-198 (1946)
- 44.. Dische, Z.: A Modification of the Carbazole Reaction of Hexuronic Acids for the Study of Polyuronides.
J. biol. Chem. 183, 489 (1950)
- 45.. Houben-Weyl Methoden der organischen Chemie.
4.Aufl. 11/2 , 592-604 (1958)
46. Beyer, L., M.W. Slein, S.P. Colowick and C.F. Cori
Journal gen. Physiol. 29, 379 (1946)
- 47.. Barnum, C.P., C.W. Nash, E. Jennings, O. Nygard, H. Vermund: The separation of pentose and desoxypentose nucleid acids from isolated mouse liver cell nuclei.
Arch. Biochem. 25, 376 (1950)
48. Bellamy, L.J.. Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution
2.Aufl. 156 (1966)
49. Brade, W., H. Herken, H.J. Merker: Schädigung und Regeneration renaler Tubuluszellen nach Folsäuregabe.
Arch. Pharmak. exp. Path. 262, 228-250 (1969)

50. Kaplan, N. O., A. Goldin, St. R. Humphreys, M. M. Ciotti,
M. Venditti: Significance of enzymatically catalyzed
exchange reactions in Chemotherapy.
Science, 120, 437 (1954)
51. Albert, A.: Chemie der Heterocyclen.
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr.,
49 (1962)
52. Albert, A.: Chemie der Heterocyclen.
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr.,
331-333 (1962)
53. Fischer, M.: Untersuchungen über die Spezifität von
Nucleosidase-Enzymen.
Inaugural-Diss. Math.nat. Fakultät der
FU Berlin (1964)
54. Brunnemann, A., H. Coper, D. Neubert: Biosynthese und Win-
kung des 6-Aminonikotinamid-adenin-di-
nucleotids (6-ANAD).
Arch. exp. Path. Pharmak. 246, 437 (1964)
55. Albert, A.: s. 52 Seite 85
56. Lehmann, K.: Trennung, Isolierung und Identifizierung
von Stoffwechselprodukten des Triamterens.
Arzneimittelforschung, 15. Jhg, 812-816,
(1965)
57. Schabarek, A.: Inaugural-Diss. Math. nat. Fakultät der
FU Berlin, 46 (1968)
58. Threlfall, G. , D.M. Taylor: Modification of folic acid-
induced changes in renal nucleic acid and
protein synthesis by actinomycin D and
cycloheximide.
Europ. J. Biochem. 8, 591 (1969)
59. Brade, W., H. Herken, H.-J. Merker: Regeneration of Renal
Tubular Cells after Lesion by Temporary
Ischaemia, Folic Acid, and 2,4,5-Triamino
6-Styrylpyrimidine
Arch. Pharmak. 266, 95-100 (1970)

60. Mikolajewski, V.: Beeinflussung der Folatreduktase durch Triamteren und Triamterenderivate.
Inaug.-Diss., Med.Fak. FU Berlin (1968)
61. Taylor, D.M., G. Threlfall, A.T. Buck: Chemically-induced renal hypertrophy in the rat.
Biochem. Pharmacol. 17, 1567 (1968)
62. Haddow, A.: In: Chemistry and biology of pteridines
p. 100. London: Churchill (1954)
63. Threlfall, G., D.M. Taylor, A.T. Buck: The effect of folic acid on growth and deoxyribonucleic acid synthesis in the rat kidney.
Lab. Invest. 15, 1477 (1966 a)
64. Herken, H., P. Voß, W. Brade, H. Kolbe: Induction of Glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 6-phosphogluconate-dehydrogenase in the regenerating Kidney after Lesions by Drugs.
Arch. Pharmak. exp. Path. 267, 297-306 (1970)
65. Gerlach, E., B. Deuticke, R.H. Dreisbach, C.W. Rosarius: Zum Verhalten von Nucleotiden und ihren dephosphorylierten Abbauprodukten in der Niere bei Ischämie und kurzzeitiger post-ischämischer Wiederdurchblutung.
Pflügers Archiv. 278, 296-315 (1963)
66. Albert, A., D.J. Brown, G. Cheeseman: J. Chem. Soc. 4219 (1952)
67. Schmidt, U.C., Dubach, J. Torhorst: Behaviour of Sodium- and Potassium-activated Adenosintriphosphatase in Rat Kidney tissue by folic acid
Experientia 25, 1288 (1969)
68. Herken, H., G. Senft, W. Schwarz und H.J. Merker: Struktur und Funktion der Glomerula nach Einwirkung von Glucocorticoiden bei der Aminonucleosidnephrose.
Arch. exp. Path. Pharmak. 245, 289 (1963)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr. Herken und
Herrn Dr. Brade für wertvolle Anregungen, sowie
Fräulein Dagmar Schmidt für technische Unterstützung.

LEBENS LAUF

13. 4.1938 Geburt in Bammental
- Nov. 1945 Einschulung 25.Grundschule Berlin-Hermsdorf
- April 1951 Übergang zur Oberschule Technischen Zweiges
Berlin-Hermsdorf
- April 1954 Abschluß der Oberschule Technischen Zweiges und
Übergang zur 5.Oberschule Wissenschaftlichen
Zweiges (Georg-Herwegh-Schule) Berlin-Hermsdorf
27. 2.1959 Abitur an der 5.Oberschule Wissenschaftlichen
Zweiges
1. 4.1959 Beginn der Apothekerpraktikantenausbildung in der
Apotheke am Markt bei Apotheker Karl Heinz Wittwer
20. 3.1961 Pharmazeutisches Vorexamen in Berlin
- 27.11.1961 Beginn des Studiums am Anorganischen Chemischen
Institut der FU Berlin
- SS 1964 Fachrichtungswechsel Pharmazie
- 26.10.1966 Pharmazeutisches Staatsexamen an der FU Berlin
- 15.11.1966 Beginn der Doktorandenzeit am Pharmakologischen
Institut der FU Berlin
7. 7.1967 Heirat
1. 1.1968 Approbation als Apotheker
23. 1.1968 Geburt des 1. Kindes
1. 9.1969 Beginn der pharmazeutischen Tätigkeit in der
Elch-Apotheke Berlin-Frohnau
23. 4.1971 Geburt des 2. Kindes

Druck:
Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -
1 Berlin 41, Kelchstraße 31

